



**BEST AVAILABLE COPY**

Patent  
Customer No. 22,852  
Attorney Docket No. 04853.0086

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of: )  
)  
OGATA et al. ) Group Art Unit: 1646  
)  
Application No.: 10/019,571 ) Examiner: Ruixiang Li  
)  
§ 371 Date: December 31, 2001 )  
)  
PCT Filing Date: July 3, 2000 )  
)  
For: THERAPEUTIC AGENT FOR )  
DISEASES CAUSED BY PTH OR )  
PTHrP )

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

**Declaration Pursuant to In Re Hawkins, 179 U.S.P.Q. 157 (C.C.P.A. 1973)**

I, Rebecca M. McNeill, do hereby declare and say that:

1. The specification at page 7, second paragraph is amended to recite that "[i]n the present specification, the term 'a PTH receptor or PTHrP receptor' is used to mean a receptor binding to PTH or PTHrP, and examples include a PTH/PTHrP type I receptor (described in Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598; SEQ ID NO: 76)."

The amendatory material is shown with underlining.

2. This amendatory material (SEQ ID NO. 76) is quoted from the reference cited in the same paragraph. See Japanese Patent Application Laying-Open (kohyo) No. 6-506598, Figure 6; See *also* WO 92/17602, the English-language equivalent, Figure 6 and description of the drawings at page 8, third paragraph. This Japanese patent application is incorporated by reference on page 84, lines 5-6 of the specification.

3. Thus, no new matter is introduced by way of this amendment.

4. I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true; that all statements made on information and belief are believed to be true; that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code; and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.

Dated: November 18, 2004

By: Rebecca M. McNeill  
Rebecca M. McNeill  
Reg. No. 43,796

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506598

第1部第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)7月28日

|                            |       |         |                 |
|----------------------------|-------|---------|-----------------|
| (51) Int. Cl. <sup>8</sup> | 識別記号  | 序内整理番号  | F I             |
| C 1 2 N 15/12              | Z N A |         |                 |
| A 6 1 K 37/02              | A D D | 8314-4C |                 |
|                            | A E G |         |                 |
|                            |       | 9050-4B | C 1 2 N 15/ 00  |
|                            |       | 8412-4B | 5/ 00           |
|                            |       |         | A               |
|                            |       |         | B               |
|                            |       |         | (全 26 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平4-510035  
 (86) (22) 出願日 平成4年(1992)4月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成5年(1993)10月5日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 2 / 0 2 8 2 1  
 (87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 7 6 0 2  
 (87) 国際公開日 平成4年(1992)10月15日  
 (31) 優先権主張番号 6 8 1 . 7 0 2  
 (32) 優先日 1991年4月5日  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I T, L U, M C, N L, S E), C A, J P

(71) 出願人 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン フルーツストリート 55  
 (72) 発明者 セグレ ギノ ブイ  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウエイランド セジメドウロード58  
 (72) 発明者 クロネンベルグ ヘンリー エム  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベルモント ヘイスティングスロード 48  
 (74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 副甲状腺ホルモンのレセプターとそれをコードしているDNA

(57) 【要約】

副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA、組換え及び合成副甲状腺ホルモンレセプターポリペプチド及びその断片、副甲状腺ホルモンレセプター及びレセプター断片に対する抗体、候補化合物を副甲状腺ホルモンレセプターの作用に対するアンタゴニストあるいはアゴニスト効果についてスクリーニングする方法、及びこれらの化合物の利用による診断と治療法が開示される。

## 特 許 平 6-506598 (2)

## 請求の範囲

1. 抗体産生の調節レセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAであって、同定レセプターが、図3に示されているアミノ酸配列に少なくとも30%の同一性を持つアミノ酸配列を持つことを特徴とする方法。
2. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNA配列が図1に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 1) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。
3. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 3) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。
4. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記分離されたDNAが (E A 6) であって、ATCCに寄存され、ATCC登録番号6570と呼ばれていることを特徴とする方法。
5. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図6に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID NO. 4) の本質的にすべてをコードしていることを特徴とする方法。
6. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図1に示されているDNA配列 (SEQ ID NO. 1) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。
7. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図3に示されているDNA配列 (SEQ ID NO. 3) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。
16. 請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、前記部分が前記調節性ホルモンレセプター遺伝子のすべてよりも短いことを特徴とする方法。
17. 請求項15に記載されている1本鎖DNAであって、上記DNAが検出されて検出可能であることを特徴とする方法。
18. 副甲状腺ホルモンレセプターcDNAの1部からなる1本鎖DNAであって、上記部分が少なくとも18ヌクレオチドの長さであることを特徴とする方法。
19. 請求項18に記載されている1本鎖DNAであって、前記DNAがアンチセンスであることを特徴とする方法。
20. 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしている複製DNA分子の発現によって生成される副甲状腺ホルモンレセプターを特徴とする方法。
21. 請求項20に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターの本質的に複製された断片を特徴とする方法。
22. 請求項21に記載されているDNAの発現によって、生成される副甲状腺ホルモンレセプターの本質的に複製された断片を特徴とする方法。
23. 少なくとも1つの抗体アミノ酸、そして副甲状腺ホルモンレセプターの完全なアミノ酸配列より少ないアミノ酸からなるポリペプチドであって、上記ポリペプチドが副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来ることを特徴とする方法。
24. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記副甲状腺ホルモンレセプターがヒト副甲状腺レセプターであることを特徴とする方法。
8. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、前記DNAの配列が図6に示されているDNA配列 (SEQ ID NO. 4) とハイブリッドを形成することを特徴とする方法。
9. ベクターの複製体であって、前記ベクターが副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。
10. 請求項1に記載されている分離されているDNAを含む細胞であることを特徴とする方法。
11. 請求項10に記載されている細胞であって、前記細胞が前記の分離されているDNAから上記調節レセプターを発現する能力のあることを特徴とする方法。
12. 本質的に均質な細胞群であって、そのうちの請求項1に記載されている分離されたDNAを含むことを特徴とする方法。
13. 分離されたDNAが、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合することの出来るポリペプチドをコードしているDNA配列からなることを特徴とする方法。
14. ポリペプチドを生成する方法で、前記方法が以下のことからなることを特徴とする：
  - (a) 副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を培養する。及び
  - (b) 前記DNAからポリペプチドの発現を可能にする条件下に前記細胞を培養する方法。
15. 副甲状腺ホルモンレセプター遺伝子の1部からなる1本鎖DNAであって、前記部分が少なくとも18塩基の長さであることを特徴とする方法。
25. 請求項23に記載されているポリペプチドであって、上記断片が以下のものからなることを特徴とする方法。
  - (a) T W E T R E R E V F D R L G M I Y T V G、
  - (b) Y L Y S G F T L D E A E R L T E E E L、
  - (c) V T F F L Y F L A T N Y Y W I L V S G、
  - (d) Y - R A T L A N T G C W D L S S G H K K W I I Q V P、
  - (e) P Y T E Y S G T L W Q I Q M H Y E M、
  - (f) D D V F I K E E Q I F L L E R A Q A、
  - (g) F P R L H C T R N Y、
  - (h) E K K Y L W Q P T L、
  - (i) V L A T K I R E T N A C R C G T R Q Q Y R K L L K、あるいは
  - (j) 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質を結合出来る (a) から (i) の断片。
26. 複製上誘発される断片中に、(a) 副甲状腺ホルモンレセプターあるいは (b) 上記レセプターの断片からなるポリペプチドを含む複製産物を発現する方法。
27. 副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成することが出来る断片を特徴とする方法。
28. 請求項27に記載されている抗体と複製上誘発される断片からなる複製産物を特徴とする方法。
29. 動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項26に記載されている複製産物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。



# 請求項6-506528 (9)

30. 動物の血中カルシウムレベルを低減する方法であって、請求項28に記載されている治療化合物を、上記動物に、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による、上記動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化の阻害に効果的な用量で投与することからなることを特徴とする方法。

31. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を同定する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 請求項23に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモンと、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモンへの結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

32. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のある化合物を同定する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 請求項23に記載されているポリペプチドを副甲状腺ホルモン関連蛋白質と、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記ポリペプチドの副甲状腺ホルモン関連蛋白質への結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し、上記副甲状腺ホルモン関連蛋白質と競合する能力のあることを示唆する。

37. 副甲状腺ホルモンレセプターあるいはその断片をコードしているDNA配列からなるトランス遺伝子を持つ細胞株またはヒト以外の脊椎動物を特徴とする方法。

38. 以下の内容からなる診断法を特徴とする方法：

- (a) 動物から1回目の血液試料を取り；
- (b) 請求項33に記載されている化合物を上記動物に投与し；
- (c) 上記化合物の上記投与のあとに上記動物から2回目の血液試料を取り；
- (d) 上記1回目の血液試料中のカルシウムレベルを上記2回目の血液試料中のものと比較し、上記2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方が低い場合は、副甲状腺ホルモン関連の状態の診断に役立つ。

39. 請求項1に記載されている分離されたDNAであって、上記DNAの配列が副甲状腺ホルモンレセプターをコードしていることを特徴とする方法。

40. 請求項26に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

41. 請求項23に記載されているポリペプチドを治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

42. 請求項27に記載されている抗体を治療及び診断に用いることを特徴とする方法。

43. 請求項26に記載されている治療化合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

43. 副甲状腺ホルモンレセプターへの結合に対し、副甲状腺ホルモンと競合する能力のある化合物を同定する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- (a) 副甲状腺ホルモンを請求項31に記載されている細胞と、換骨化合物の(1)存在下あるいは(11)非存在下に接触させる、及び
- (b) 上記換骨化合物の存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(1)を、上記換骨化合物の非存在下における上記副甲状腺ホルモンへの上記レセプターの結合レベル(11)と比較する；上記換骨化合物の存在下における結合レベルが、その非存在下よりも低い場合は、上記換骨化合物は上記レセプターへの結合に対し上記副甲状腺ホルモンと競合する能力のあることを示唆する。

34. 副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質の細胞膜上の副甲状腺レセプターへの結合を阻害する能力のある化合物を特徴とする方法。

35. 請求項34に記載されている化合物と製剤とを投与される動物からなる治療化合物を特徴とする方法。

36. 副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相応するDNA配列を同定する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする：

- ゲノムあるいはcDNAライブラリーをスクリーニング；
- 上記ライブラリーを請求項38に記載されている1本鎖DNAと、上記1本鎖DNA及び上記ライブラリー中の相同DNA配列間にハイブリッド形成可能なように非存在下に接触させ、及び
- 上記ライブラリーから、上記1本鎖DNAとハイブリッド形成しているクローンを割り出し検定する。そして、ハイブリッド形成は、上記クローンの中に、副甲状腺ホルモンレセプターをコードしているDNA配列に相応するDNA配列の存在することを示唆する。

44. 請求項28に記載されている治療化合物を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いることを特徴とする方法。

45. 請求項20に記載されている副甲状腺ホルモンレセプターを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

46. 請求項23に記載されているポリペプチドを、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

47. 請求項27に記載されている抗体を、副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質による動物の副甲状腺ホルモンレセプターの活性化を阻害するための、あるいは、動物の血中カルシウムレベルを低減するための治療に用いる薬剤の製造に利用することを特徴とする方法。

48. 患者における副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質によって媒介される高カルシウム血症状態を低減する方法であって、該方法が以下の内容からなることを特徴とする方法：

- (a) 患者からの1回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、
- (b) 請求項28に記載されている治療化合物の投与後のある時期に患者から採取された2回目の血液試料中のカルシウムレベルを測定し、
- (c) 2つの血液試料中のカルシウムレベルを比較して、2回目の血液試料中のカルシウムレベルの方がより低い場合は、患者に副甲状腺ホルモンあるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質に拮抗する状態のあることを示唆する。

### 符表平6-506598 (4)

以月 和田 隆

地獄の書

ここに記載する研究の助成金は一併アメリカ合衆国政府によって提供されたものであり、国政府は本報紙に対し一写の権利を保有する。

※説明は内分泌システマーに関する。

ホルモン作用機構の重要な段階は、ホルモンと細胞内受容体の型別質膜表面上にあるレセプターとの相互作用である。ホルモン-レセプター複合体の形成によって、細胞内シグナルを細胞内に導入して種々の生物学的反応を誘発することが可能となる。例えば、細胞内受容体ホルモン（PGE<sub>2</sub>）、甲状腺素ホルモン（LH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び成長因子様細胞刺激ホルモン（CG）のようなホルモンの、その細胞内レセプターへの結合はレセプターの形状変化の誘発をもたらし、その結果、遺伝子発現と細胞分裂、脂質、糖質、その一部分が（G<sub>2</sub>）による制御性遺伝子マクロオキシド（CpP）結合蛋白質との連関が起こる。この過程はアデニル酸シクロラーゼを刺激し、次いで蛋白質のリン酸化、ヌクレオチドの合成と分泌、及びイオンチャネルの調節のような他の細胞内過程を刺激する。アルミニウム（Al<sup>3+</sup>）、アンモニア（NH<sub>3</sub>）、及びノルエピネフリンを含む他のホルモンの、その細胞内レセプターへの結合の結果、（G<sub>p</sub>）のような別のタイプのGTP結合蛋白質成分の活性化をもたらし、次いで酵素ホスホリラーゼの活性化を刺激する。ホスホリラーゼによる加水分解の生成物は、細胞内カルシウムの動員と蛋白質のリン酸化を含む細胞内現象の連鎖的なカスケードを引き起こす。

副甲状腺ホルモン（PTH）はカルシウムの恒常性維持に主要な調節物質であり、その重要な標的細胞は骨と腎臓に存在する。カルシウム濃度の調節は、腎臓、筋肉、神経、肝臓、及び心血管系などの系の正常な機能のために必要である。PTHの合成と分泌は、主として血中のカルシウムレベルによって調節される：低レベルはホルモンの合成と分泌の両方を刺激し、高レベルは抑制する。次いでPTHは、骨組織との主要な相互作用、すなわちカルシウム交換調節、知覚、思、性、及

腎臓におけるカルシウムの血中への注人を促進することによって血漿カルシウムレベルを維持する。PTHは腎臓における近位型ビタミンDの合成を誘発することによってカルシウムの腎臓からの尿排泄を抑制する。PTHは近位小腸を刺激し、また、間接的に、骨吸収細胞である破骨細胞の分化を促進することによって骨からのカルシウム再吸収を促進する。このホルモンは、また、腎臓に少なくとも3つの効果：近位型カルシウム再吸収の刺激、リン酸クリアランスの向上、及び活性型ビタミンDの合成を完結する酵素の増大促進を伴う。PTHによるレセプター仲介のホスホリラーゼCの活性化も報告されているが (Hruska et al., J. Clin. Invest. 79: 230, 1987)、PTHはこれらの効果を生としてレセプター仲介によるアデニル酸シクラーゼの活性化を通じて発現する。

カルシウム調節性の調節は多くの臨床的障害（例えば、低血圧、低血圧、貧血、腎障害、低血圧、肺障害、及び神経障害）を引き起こすことがあり、普通は、低血圧、低血圧、低血圧のレベルの発生を促すような状態に起因するものである。高カルシウム血症は前駆カルシウムレベルの上昇を特徴とする症状である。それは、しばしば、低血圧の病歴（例えば、肺病、腎病、または癌腫）の結果として、P-T間の生理学的変化を伴う一次代謝的異常（低血圧）に関連している。もう一つのタイプの高カルシウム血症、悪性の神経性高カルシウム血症（H型）は、ほとんどが悪性の癌腫の産物である。それは大抵の場合、癌腫（肺癌、腎臓、肝臓、脾臓または膵臓の癌腫）によるP-T波とS-T波の非相対性を共有する新しいクラスの蛋白変性ホルモンの生成に起因するようである。これらのP-T間関連蛋白質（P-T<sub>1</sub>、P-T<sub>2</sub>）は一見、P-T間の質素と癌腫に対する作用のあるものを模倣し、これらの組織におけるP-T受容体と相互作用すると信じられている。P-T<sub>1</sub>は、通常、ケラチノサイト、癌、下基性、肺がん、肝臓癌、腎臓癌、肺がんの癌腫、癌腫性癌腫、及び癌腫性癌腫を含む多くの組織に少量見出される。多くのH型関連癌腫において、P-T<sub>1</sub>は癌腫系に高レベルで見出され、H型の高カルシウムレベルを来する。

## ・衆明の契機

本発明は培養細胞中の細胞のレセプター、望むべくは、創製抗体中モノクローナルレセプターをコードしているDNA配列からなる分離されたDNAを特徴とする。このレセプターは、図3に示されているアミノ酸配列 (SEQ ID No. . 3) に少なくとも25と30% (望ましいのは少なくとも50%, 更に望ましいのは少なくとも60%, そして最も望ましいのは少なくとも75%) 同一のアミノ酸配列をもつものである。即ち、2つのアミノ酸配列間で「簡単な方法を用いて」最近共通祖先を推定する場合、両者の配列のアミノ酸残基の少なくとも30%が両者の配列のアミノ酸数と同一となることである。「分離された」とは、このDNAが、本発明のDNAが由来する(好であれば)生物に本来あるゲノム内で、本発明のDNAをコードしている塩基対に直接隣接している遺伝子のコーディング配列を全く内包しないということを意味する。分離されたDNAは1本鎖、または2本鎖でもよく、また、ゲノムDNA、cDNA、置換えハイブリッドDNA、あるいは合成DNAでもよい。それは自然に存在する細胞のレセプター (例えば、PTDレセプター) をコードしているDNA配列と同一かも知れず、あるいは、このような配列とは、1つあるいはそれ以上のヌクレオチドの欠落、付加、または置換によって異なるかも知れない。本発明の1本鎖DNAは、一般に少なくとも8ヌクレオチドの長さを持つ (望ましいのは、少なくとも38ヌクレオチドの長さ、そして更に望ましいのは30ヌクレオチドの長さ)、遺伝子あるいはcDNAの全長に及ぶこともある。これらはハイブリッド形成プロープとして用いるため、成虫されるように標識されていることが望ましく、また、アンチセンスのこともあり得る。出発後、この分離されたDNAは高変異繁殖条件下に、図1 (配列番号1以下、SEQ ID NO. 以下) で表す: 1)、図2 (SEQ ID NO. 2)、図3 (SEQ ID NO. 3)、あるいは図4 (SEQ ID NO. 4) に示されているDNA配列の全体、あるいは一部とハイブリッドを形成することが望ましい。「高変異繁殖」とは、例えばヒト腎臓のPTDレセプターcDNAの分離のための以下に記述されているような条件を意味する (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989年巻の「Genetic Engineering」の項を参照せよ)。最も望ましいのは細胞

が哺乳類(ヤブサシム、ラットあるいはヒト)であり、DNA配列が型1 (SEQ ID NO. : 1)、図2 (SEQ ID NO. : 2)、図3 (SEQ ID NO. : 3)、あるいは図6 (SEQ ID NO. : 4)に示されているアミノ酸配列を本質的にすべてコードしており、あるいはAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託され、ATCC受託番号68070あるいは68573と名付けられているプラスミドの1つのコーディング配列によってコードされていることである。本発明のDNHは、この発明の細胞レセプター(例えば、副甲狀腺ホルモンレセプター)、あるいはそのレセプターの配列をコードするDNA配列を含むあるベクター(それは細胞製品(例えば、ライブラリーを形成するベクターの混合物から分離されたあるベクター)として製造されるかも知れない)は、及びそのベクター(あるいは上記の分離されたDNA)を含む細胞、または本質的に相同な細胞集団(例えば、胚性細胞、あるいは哺乳動物胚盤のような胚性細胞)に移植込まれることもあり得る。“本質的に相同”とは、少なくとも90%の細胞が本発明のベクター(あるいは、場合によっては分離されたDNA)を含むことを意味する。望ましいのは、このベクター(例えば、R253B)が副甲狀腺ホルモンレセプターの発現を(例えば、ベクターを注入する、あるいはベクターで形質転換された細胞に)指示する能力を有することである。

別の観点から見ると、本発明は、加齢レセプターをコードしている環境DNA分子の発現によって生成される加齢レセプター、置換しくは新形成体ホルモンレセプター（あるいはその実質的に生成された複製）を生成とする。"本質的に生成された複製"とは、それが自然状態下で結合している配列質や配列を實質的には含まない製品のことである。

開通した観点からは、本発明は、自然状態下に存在するこの発明の断片セプターの断片を含むポリペプチドを特徴とする。望ましいのは、このポリペプチドが、別甲状銅ニルモンあるいは別甲状銅水ニルモン関連蛋白質と競争する能力を持つ自然状態下に存在する別甲状銅ニルモンセプターの断片を含むことである。好適な実施態様では、この断片は少なくとも二つあるアミノ酸の残基で、以下のグループから選ばれた配列を持つ。

特表平6-506598 (B)

(a) TNGTREREVEFDRLCMITYVG; (SEQ ID NO. 5)  
 (b) YLYSGFTLEEARLTZEEL; (SEQ ID NO. 6)  
 (c) VTFFLYFLATNYVWILEVG; (SEQ ID NO. 7)  
 (d) Y-RATLANTGCWDLSSCHKKWIIQVP; (SEQ ID NO. 8)  
 (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM; (SEQ ID NO. 9)  
 (f) DDVFTKZEQIFLLHRAQA; (SEQ ID NO. 10)

(g) FFRHLCTRNY; (SEQ ID NO. 11)  
 (h) EKKYLWGFIL; (SEQ ID NO. 12)  
 (i) VLATKLRETNAGRCDTROQYKLLK; (SEQ ID NO. 13) あるいは

(j) 断片 (即ち、少なくとも6個の塩基を持つが、全体よりは短い部分) あるいは (k) - (i) の配列体 (アナログ) で、副甲状腺ホルモン、あるいは副甲状腺ホルモン関連蛋白質 (ここで「類似体 (アナログ: analog)」とは、それが類似体であるペプチドと少なくとも0% (そして望ましいのは少なくとも70%) 程度の配列を持つペプチドを造る) を結合する能力を持つもの。出来れば、本発明のペプチドは細胞内DNA分子の範囲によって生成されるか、または合成品 (即ち、生物学的よりも化学的な手段によって組み立てられた) であることが望ましい。本発明はこのようなペプチドを生成する方法を提供し、この方法には、本発明の細胞レセプター、あるいはレセプターの断片をコードしている分離されたDNAを含む細胞を提供すること、及びこの細胞を、分離されたDNAからペプチドの発現を可能にするような条件下で培養することが含まれる。

本発明は、また、この発明の細胞レセプター (出来ればヒトのPTHレセプターのような副甲状腺ホルモンレセプター) と免疫複合体を形成する能力のある抗

体 (モノクローナルまたは多クローナル) 及び試体の付加製品を特徴とする。このような試体は、従来として (1) 本発明の細胞レセプターの断片を含むポリペプチド、あるいは (2) 細胞膜上に存在する本発明の細胞レセプターを閉じることによって生成される。この試体は、出来れば、本発明の細胞レセプターの塩基 (即ち、レセプターにそのリガンドが結合する時、レセプターによって本発明の起こされるカスケード反応の一部を形成するもの) を中和 (即ち、部分的に、または完全に阻害する) する能力を持つことが望ましい。前述の実験例において、本発明の試体は副甲状腺ホルモンレセプターと免疫複合体を形成する能力を持ち、PTHレセプターの生物学的活性 (即ち、アデニル酸シクラーゼの活性化、あるいはホスホリラーゼCの刺激) を中和することが出来る。

また本発明には、飼料上許容量ある組成中に、(x) 本発明の細胞レセプター、(y) 本発明の細胞レセプターの断片を持つポリペプチド、あるいは (z) 本発明の細胞レセプターに対する抗体を含む飼料添加物が含まれる。これらの飼料添加物は、本発明の細胞レセプターのリガンドによる過剰刺激を抑制する種々の疾病を処置する手段を提供する。好適な実施態様において、本発明のポリペプチドにはPTHレセプター、PTHレセプターの断片、及びPTHレセプターと免疫複合体を形成する抗体が含まれる。これらのポリペプチド及び試体は、PTHあるいはPTHrPに関連する高カルシウム血症の処置を、これは関連のないものと区別するための診断用薬として有用である。

本発明の複製プローブは、遺伝子工学の一般研究が、細胞レセプター同族体、あるいは本発明の細胞レセプターに関連した、いかなる動物由来にせよ、その細胞レセプターを特定し、クローニング化することを可能にし、本発明の配列の有用性を拡大する。

本発明の他の特徴と利点は、以下の詳細な実施態様の説明と請求の範囲から明らかになるであろう。

#### 発明の詳細な説明

先ず、図の簡易な説明をする。

図

図1はオポッサムの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、OK-Hをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. 1)。

図2はオポッサムの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、OK-Oをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. 2)。

図3はラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプタークローン、R15Bをコードしている塩基とアミノ酸の配列の表示である (SEQ ID NO. 3)。

図4はクローンOK-O及びR15BからのcDNAにコードされている推定アミノ酸配列の比較である。

図5はOK-O、OK-HとR15Bの推定アミノ酸配列を配列中同様に並べて並べて比較したものである。

図6はヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている塩基とアミノ酸配列の表示である (SEQ ID NO. 4)。

図7はラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプターのcDNA、ヒトのゲノムDNAクローン及びヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている2つのcDNAクローンの略図である。

図8はヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターの推定アミノ酸配列の塩基性プロットである。下線される残基ドメイン1-4が示されている。A、B、Cは追加の塩基性位置を示す。

図9はOK-Hを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

図10はOK-Hを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図11はOK-Oを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

図12はOK-Oを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図13はR15Bを移入したCOS細胞へのPTHrPの結合を示すグラフである。

ある。

図14はR15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによる細胞内遊離カルシウムの刺激を示すグラフである。

図15はOK-H、OK-O、あるいはR15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによるイノシトールリン脂代謝の刺激を示すグラフである。

図16はCDM-B、OK-H、R15Bを移入したCOS細胞におけるNI・PTHによるサイクリックAMPの刺激を示すグラフである。

図17はヒトの腎臓 (AとC) 及びラットの腎臓 (BとD) のPTH/PTHrPレセプターをコードしているcDNA断片への<sup>125</sup>I-標識PTH (1-34) (AとB) 及び<sup>125</sup>I-標識PTHrP (1-36) (CとD) の結合を示すグラフである。結合するリガンドには、PTH (1-34) (□)、PTHrP (1-36) (●)、PTH (2-34) (○)、PTHrP (7-34) (△) が含まれる。データは特異的結合のパーセントとして示され、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準誤差を示すものである。

図18はヒトの腎臓のレセプターをコードしているcDNA断片における細胞内cAMPの刺激を示すグラフである。データは平均値±標準誤差を示し、少なくとも3つの独立した実験の平均値±標準誤差を示すものである。

図19はヒトの腎臓 (A) とSaeOS-2細胞 (B) から作られたcDNA (~1000bp/レーン) のノーザンブロット分析の表示である。プロットはヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。28Sと18SのリボソームRNAバンドの位置が示されている。

図20はヒトのゲノムDNAをSaeI、HindIII及びXhoI (~2000bp/レーン) で消化したもののサザンブロット分析を示す。プロットはヒトの腎臓のPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAとハイブリッドを形成した。

図21はR15Bによってコードされているラットの腎臓のPTH/PTHrPレセプターの細胞膜における免疫反応の略図である。



## 特表平6-506598 (7)

ローンはブランク法で精製され、ラムダファージDNAが分離された (Sambrook et al., 上記)。クロン化された導入断片は、ファージDNAから、制限酵素エンドヌクレアーゼ Hind III および EcoRI (ラムダGT10ライブラリー)、あるいはXhoI および SmaI (EMBLライブラリー) を用いて取り出され、次いで適当な制限酵素で消化された制限酵素断片を用いてpCDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA) 中にサブクロン化された。CaCl<sub>2</sub> (溶液) で精製されたサブクロンの配列決定は、Sanger (Biochem. 70: 5463, 1977) の方法に従い、ジデオキシターミネーション法 (Sequenase パージン 2 sequencing キット、United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) によって行われた。

## 逆転写とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

3 µg のヒト腎臓癌細胞のポリ(A) + RNA (Clontech, Palo Alto, CA) を73.5 µl の水の中で100℃で30秒インキュベートし、本用して反応を始め、20 µl の5xRT緩衝液 (1xRT緩衝液: 40 mM Tris-HCl, pH 8.2, 40 mM KCl, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM β-mercaptoethanol と各5 mM のデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTP))、2 µl (4単位) のRNasin (Promega Biotech, Madison, WI)、1 µl (80 pmol/µl) のヒトcDNAプライマーH12 (5'-AGATGAGGCTCTGCAAGGT-3'; SEQ ID NO. 14) と800塩基のポリ(A) RNAの逆転写酵素 (Life Sciences, St. Petersburg, FL) に加えた。反応混合液を42℃で40分インキュベートした。次いで、10分の1倍の最初の混合液を反応混合液は、PCRにより、3 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM のdNTP、250 µM のVentポリメラーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA) と各2 µM の正方向と逆方向のプライマー (PCRの条件: 変性、1分間、94℃; アニリング、1分間、50℃; 延伸、72

℃で3分間; 40サイクル) を含む反応混合物100 µl の中で増幅された。

2つの独立したPCRは、以下の2つの異なる正方向のプライマーを用いて行われた: (1) 2つの以前にクロン化されたPTH/PTH+プライマー  
G CC

(上述) コーディング領域に基づく逆転写プライマーPK-1 (5'-CGAATTCATGGGACCGGCTCCGAT-3'; SEQ ID NO. 15)、及び、(2) ヒトゲノムクロンHVG1の5'-非コーディング領域に基づくプライマーPK-2 (5'-CGGATCCCGCGGCGCTACCGCGT-3'; SEQ ID NO. 16)。両PCR反応はヒトのPTH/PTH+プライマーのコーディング領域の713~731番目のヌクレオチドを覆すプライマーH26 (5'-AGTATAAGCGTCTTACGAG-3') を用いた (図4)。PCRの生成物はクローニングのために、EcoRVで切断されて、転写されたpCDNA1にクロン化された。

ノーザンブロット分析: 総RNAは5AOS-2細胞及びヒト腎臓癌からアミノグリコシドアセト (Chirgwin et al., Biochem. 18: 5294, 1979) によって抽出された。ノーザンブロット分析のため、~10 µg の総RNAが1.5% / 3%ホルムアルデヒドゲル上での電気泳動にかけられ、ニトロセルロースフィルター (Schleicher and Schuell, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上を参照)。フィルターは、0.5x SSC / 0.1% SDS の洗液で洗滌後30分、60℃で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

サザンブロット分析: ヒトゲノムDNAはSDS / プロテイナーゼ法 (Goss-Ballard et al., Eur. J. Biochem. 36: 32, 1973) を用いて生成された。サザン分析のため、~10 µg のDNAがSmaI, PvuII及びXhoIによって消化され、0.8%アガロースゲル上の電気泳動にかけられ、ニトロセルロース膜 (Schleicher and

nd Schull, Keene, NH) にブロットされた。ハイブリッド形成条件はファージライブラリースクリーニングの条件と同じであった (上を参照)。フィルターは、0.5x SSC / 0.1% SDS の洗液で洗滌後30分、50℃で洗浄し、オートラジオグラフィーのために露出した。

## 細胞分析

COS細胞に発現されたクロン化プライマーの遺伝的活性を特徴づける実験は以下のものが含まれた:

1) PTHとPTH+Pの断片及び細胞体の融合。

1) PTHとPTH+Pの断片及び細胞体によるマイクロRNAの複製の形成。

2) PTHとPTH+Pの断片及び細胞体による細胞内のカルシウム濃度の増大、及び

3) PTHとPTH+Pの断片及び細胞体によるインシノールリン酸代謝の活性化。方法は次の通りである。

## マイクロRNA複製アッセイ

[N19<sup>+</sup>, N19<sup>-</sup>, Tyr<sup>34</sup>] bPTH-(1-34) フラグ (N19 PTH) 及び [Tyr<sup>34</sup>] PTH+P (1-36) フラグ (PTH+P) は Na<sup>125</sup>I (約はなし, New England Nuclear, Boston, MA) により放射線 (Sage et al., J. Biol. Chem. 254: 6980, 1979) に従ってラベル化され、逆転写PCRによって増幅された。細胞に送ると、標識されたペプチドは0.3%のトリフルオロ酢酸 (TFA) に溶かされ、C<sub>18</sub> Sephadexカートリッジ (Waters Associates, Inc., Milford, MA) にかけて、0.1% TFA 中60%アセトニトリル溶液によって洗脱された。逆転写後、ラジオリガンドは、次いで、C<sub>18</sub> Sephadexカートリッジ (3.9 mm x 30 cm, Waters Associates) にかけて、0.1% TFA 中30-50%のアセトニトリルの線形濃度勾配を用い、2 ml / 分の流速で30分かけて洗脱した。ラジオリガンドは、2つのピークに別れて洗脱した。最

初めのピークは約38%のアセトニトリルのところで洗脱し、より高い結合と特異的結合を示したので、この研究に用いられた。比活性は500 ± 75 mCi / mgで、これは平均のノーザンブロットに相当する。

COS-7細胞は15 cmのプレートで、DMEM、10%の胎児血清FBS、10 mg / Lゲンタマイシン中、80-90%の密着度まで培養された。DMSO / デキサメタゾン法 (Sambrook et al., 上記) により1-2 µg のプラスミドDNAを移入した24時間後、細胞をトリプシン処理し、多穴ガラスプレート (底径16あるいは30 mm, Corning, Cambridge, MA) に、細胞密度 5 × 10<sup>4</sup> 細胞 / cm<sup>2</sup> で再配分した。細胞数は移入後わずかに増加したのみであった。更に培養を48時間続けた後、ラジオリセプターアッセイが行われた。培養地盤は、研究細胞と、50 mM Tris-塩酸 (pH 7.2), 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 0.5%胎児牛血清 (FBS), 5%胎児牛血清 (FBS), 5%胎児牛血清 (FBS) の細胞懸濁液 (KC Biolabs, Inc., La Jolla, CA) を含む培養液と交換された。特に指示のない限り、研究は、細胞をこの培養液中、15℃、4時間、4 × 10<sup>5</sup> cells / ml (9.6 × 10<sup>11</sup> cells) の125I-標識のPTH+PであるPTH+Pとインキュベートして行われた。

インキュベーションは、細胞液を吸い取り、培養液を加え、50% NaCl 溶液で洗い流し、15分間洗滌することによって終了させた。細胞に結合した放射線は、各ウェルに濃液 (3回) 1 N NaOH (200 µl) を加えることによって回収された。空室で30分後、このNaOHはガラス管に移された。二回目、三回目の1 N NaOH (200 µl) による抽出を、一回目のものと合わせ、放射線計測器 (Packard Instruments, Downers Grove, IL) で測定された。細胞を含む培養液へのトレーサーの付着は、たとえ空室が洗滌地盤とブレインチューブに洗滌されても、無洗出される程度であった (加えられた洗滌液の0.2%以下)。

## cAMP濃度の測定

細胞内cAMPの濃度は既述 (Abou-Samra et al., J.

## 特表平6-506598 (B)

22

Biological, 262:1129, 1986) のようにして測定された。24穴プレート内の細胞を0.1%BSAと2mM EDTAを含む溶液中に洗浄した。次いで、細胞はPTGまたはPTG-RPと15分間、37°Cでインキュベートした。上清を除き、細胞は直ちにプレート全体をドライアイス粉末中に置くことによって凍結した。細胞内cAMPは1mlの50mM Tris-HCl中で細胞を溶かすことによって抽出され、抗cAMP抗体(例、Sigma, St. Louis, MO)を用い、特異的ラジオイムノアッセイによって分析された。cAMPの代わりにトレーサーとして用いられたcAMP類似体(2'-O-メチルアデノシン3',5'-サイクリックヌクレオチドシリン酸トシメチルエステル、Sigmaより購入)は、クロロミド法により放射化された。遊離のヨウ素は、ヨウ素化されたcAMP類似体を18Sセパレーションカラム(Whatman, Milford, MA)に吸着することによって除去した。dH<sub>2</sub>Oで洗浄後、ヨウ化cAMP類似体はSephadexカラムから4.0%アセトニトリル(ACN)と0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)によって洗出された。ヨウ化cAMP類似体は放射能測定、3mlの0.1%TFAに溶かし、C18逆相FPLCカラム(Whatman)に注入された。カラムを0.1%ACNの1%TFA溶液で平衡し、0.1%TFA中、10-30%ACNの密度勾配で洗出した。この操作によりモノヨウ化cAMP類似体で、非ヨウ化cAMP類似体から分離することが可能となる。トレーサーは20°Cで凍結する時は、4ヶ月までは安定である。アッセイに用いられた標準品、アデノシン3',5'-リン酸はSigmaから購入した。試料(1-10μlのHCl抽出液)あるいは標準品(0.04-100fmol/チューブ)を50mM酢酸ナトリウム(pH 5.5)で希釈し、トリニチルアミンと加水分解の混合液(各濃度 2:1:10μl)でアセチル化した。アセチル化後、cAMP類似体を、PBS (pH 7.4)、5mMEDTA及び1%正常ウサギ血清中に作られた抗体(1:4000)から加えた。トレーサーは、0.1%BSAを含むPBS (pH 7.4)で希釈して加えられた(20,000cpm/チューブ)。アッセイは4°Cで一晩インキュベートした。結合したトレーサーは100μlのヤギ抗ウサギ抗体(1:20, PBS中)及び1mlの7%ボラスチレングリ

ール(分子重500-6000)を加えて沈殿させ、2000rpmで30分間、4°Cで遠心した。上清を除き、結合した放射能をカウンター(Micromedix)で測定した。検量曲線はMicromedixから提供された4-パラメーターR1Aプログラムを用いて算出した。真実的な例では、アッセイ感度は0.1fmol/チューブで、トレーサーの50%を置換する標準濃度は5fmol/チューブである。

23

cAMP類似体アッセイを製造では、PTH/PTHrPレセプターcDNAを転写されたCGS細胞は、プラスチックボリスランによって、10mMトリス-塩酸(pH 7.5)、0.2mM MgCl<sub>2</sub>、0.5mMエチレンジアミンビス(2-アミノエチル)N,N'-四酢酸(EGTA)(Sigma)と1mMジチオトレイトール(Sigma)を含む溶液中に浸められる。細胞は密着に合ったダウンスホーゼナイザーの20ストロークでホモジナイズし、13,000rpmで15分間4°Cで遠心する(Copendorff, 5412型, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY)。細胞懸液を含むプレートはダウンスホーゼナイザーで20ストロークにより同じ細胞液に均質化し、更に同様に均質化して均質化液を、Lowryの方法(Lowry et al., J. Biol. Chem. 193: 265, 1951)で測定して約1.2μg/mlとする。約30μg(250μl)の膜を、様々な濃度のホルモン、または細胞の10分間、37°C(放射能測定、100μl)で、50mMトリス-塩酸(pH 7.5)、0.2mM ATP、4x10<sup>5</sup>cpm [<sup>32</sup>P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA)、9mMテオフィリン、4.2mM MgCl<sub>2</sub>、26mM KCl、0.12%BSA、及び5mMクレアチンリン酸(Schwartz/Mann Division, Section-Dickens & Co., Ossageburg, NY)とクレアチンホスホキナーゼ(Schwartz/Mann)を含むATP溶液とインキュベートする。インキュベーションは、細胞膜を破るによって開始され、100μlの20mM EDTA、pH 8.0、0.0005Mの[<sup>3</sup>H] cAMPと50mM ATPを含む溶液を加えることによって終了させる。反応混合物を凍結し、生

24

産された[<sup>32</sup>P] cAMPはイオン交換カラム(Dowex 50 W-X4, BioRad Lab, Richmond, CA)とアルミナ(Sigma)上の逆相カラムクロマトグラフィーによって精製される。[<sup>32</sup>P] cAMPはパージンレーションカウンター(Packard Instrument Co.)で、[<sup>32</sup>P] cAMPの回収に対する補正をして測定される。

## 細胞内遊離カルシウムの測定

PTH/PTHrPレセプターcDNAを転写された細胞の細胞内カルシウムレベルの測定は、Fura-2 AM (Fura-2のアセトキシエステル, Molecular Probes Inc., Eugene, OR)を用いて行われた。方法論の概要は以下の通りである:

25

CGS細胞を塗布したカバーガラスを、Fura-2 AMを封入し、以下のものを含む(最終濃度)細胞液中にインキュベートした。HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]), 20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; 4; グルコース, 10; およびFura-2 AM (1-2x10<sup>-5</sup>モル/カルボキシナフチル-2-イル)-5-アミノベンゾフラン-3-オキシル)-2-(2'-アミノ-5'-メチルフルノリル)エタン-N,N',N'-四酢酸ペンタアセトキシメチルエステル), 0.5; 37°CでpH 7.4, 95%空気と5%CO<sub>2</sub>とを45分間通した。Fura-2 AMを封入した細胞は、次いで、以下のものを含む(最終濃度)で洗浄された。HEPES, 20; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 5; NaCl, 145; MgSO<sub>4</sub>, 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; グルコース, 5; pH 7.4。エステルの封入が起きたことをチェックするために、Fura-2 AMインキュベーション後、細胞を凍結して凍結スペクトルを測定した。インキュベーション開始後5分、凍結スペクトルは約345nmにピークがあり、Fura-2 AMの不完全な加水分解を反映していたが、30分を経ると、凍結スペクトルはFura-2の値である約345nmにピークがあった。細胞の細胞の塗布を測定するために、カバーガラスを凍結後の細胞チャン

26

Biophysics Technologies, Inc., MD)に置いた。チャンパーは、シリコンカバーシールを持つテフロン製の蓋、凍結のついたコンパートメントからなっていた。カバーガラスはチャンパーの底に被覆された。カバーガラスを所定の場所に固定させるシリコンカバーには、セーター/クレーリングが計じ込められていた。温度はヒーターに0-7.4ボルトを加えることによって、22°C-37°Cの間で調整された。感度を決定しない限り、実験は37°Cで進行された。チャンパーは日立製凍結機(Ceis 1M-35, Thermo, NY)の凍結部に設置した。Fura-2の蛍光のために、コンデンサー(Photon Technologies International (PTI) Inc., NJ)の焦点におかれた75ワットのキセノンアーク灯で励起された。励起が適当な光量と透過する回転チャッパーによって与えられる回転電子単色光が、検出器に使用された。単色光の出力は調整されて一本の光の光路を形成し、細胞可能な形状を通して光の光路のハウリングを調整した。次いで、光は石英レンズを、そして100倍のニコン蛍光対物レンズを通して二倍の数を通過した。光強度は検出器による検出が光の出力測定に使用された。データの分析は、MR-DOS操作系を用いたIBM互換性AT/286コンピュータにPTIソフトウェアを使用して行った。データは正確な二倍形式に保存、操作された。

27

細胞内のカルシウム濃度は次式に従って計算された:  $[Ca^{2+}] = Kd \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$ 。ここで、Rは340と380nmにおける細胞の蛍光の比であり、R<sub>max</sub>とR<sub>min</sub>は、それぞれ、細胞内のカルシウムと大抵上ゼロのカルシウムの存在下の、Fura-2の340と380nm励起波長における蛍光強度の比であり、Rは380nmにおけるゼロカルシウム存在下のFura-2の蛍光の、細胞内のカルシウム存在下の蛍光に対する比であり、KdはFura-2のカルシウムに対する解離定数である。R<sub>max</sub>を測定するために、細胞の細胞にイオノマイシンをFura-2を封入した細胞に加えて細胞を(1mM)と細胞内環境の間のCa<sup>2+</sup>を平衡化した。次いで、R<sub>min</sub>を計算するために、1mMのEGTAを細胞溶液に加えた。異なる温度では異なる解離定数が用いられた: 34-37°Cにおいては2.4nM、及び24-2



## 特表平6-506598 (9)

アにおいては135nmである。

## イノシトールリン酸の測定

PTH/PTHrPレセプターを注入されたCOS細胞におけるイノシトールリン酸の代謝レベルは通常の細胞を用いて測定された（Bouillon-Buoniciori et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990）。

## 結果

## 分子的特徴

2つの別個のクローン（OK-1及びOK-2）は、ともにOK細胞のcDNAライブラリーから分離されたが、およそ2kbの長さを持っていた。これらのクローンの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は、表4、図1（SEQ ID NO. : 1）及び図2（SEQ ID NO. : 2）に示されている。RQ6細胞のcDNAライブラリーから分離された158bpのクローンは、およそ4kbの長さであった。ラットのPTH/PTHrPレセプターの決定されたヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列は図3（SEQ ID NO. : 3）に示されている。

3つのcDNAクローンは、イニシエーターメチオニンとして付着した膜と予想されるメチオニン残基をコードしているコドンを持つという点によって完全な長さのものと推定される。これらメチオニンコドンの後には、「シグナルペプチド」配列であることを示唆する性質を持つアミノ酸配列（DNAから翻訳して）が続く。3つのレセプターcDNAはすべて、G-蛋白結合受容体のレセプターに典型的なモデル、特定の7回-異相モデルへの「適合」を可能にする位置に特定コドンを持つ。最も重要なことは、3つのクローン化されたレセプターが、すべて、リガンドと結合して活性化された時、細胞内のメカニズムを活性化する能力を有することである。これらの特性は、分離された3つのクローンすべてが、完全長のcDNAをエンコードすることを示唆する。

図4は、OK-1及びOK-2 158bpのcDNAによってコードされているアミノ酸配列間の高度の相関性を示す。これらの2つのレセプター間には、全体で87%の相関性があり、77.8%のアミノ酸の一致がある。このアミノ酸の

高い相関性にもかかわらず、配列の一致は、PTHレセプターのアミノ酸配列が活性化の上で高度に保持されていることを証明している。これは、OK-1とOK-2の両方からのデータをヒトを含む他の動物に外挿することを可能にする。

図5は、3つのクローン化されたcDNAすべての決定されたアミノ酸配列を配列相関性によって一様に整理させたものである。OK-1配列はOK-2とG-蛋白結合受容体と同一である。ここでOK-1配列は全部で585アミノ酸残基を持つが、OK-2配列は515アミノ酸で止まっている。これは、OK-1配列と比べてOK-2配列に欠けている170のヌクレオチド（G）に起因し、前者におけるフレームシフトと止まる終止コドンの原因となっている。OK-1とOK-2が2つの別個の遺伝子の産物か、あるいは複製空の入れ違いかは不明である。

G蛋白に結合したレセプターのいくつかは、イントロン挿入の過剰によってコードされている（Koblik et al., Nature 329: 75, 1987; Koblik et al., J. Biol. Chem. 262: 7321, 1987; Becker et al., Mol. Endocrinol., 6: 70, 1992; Koblik et al., Science 238: 650, 1987; Bonner et al., Science 237: 527, 1987; Seshare et al., Nature 347: 80, 1990）。ヒトのPTH/PTHrPレセプターcDNAを単離するために、ヒトcDNAライブラリーとヒトゲノムライブラリーの両方を、ラットのPTH/PTHrPレセプターのコーディング領域の大部分を代表するプローブ（BamHI/NotI）を用いてスクリーニングした（図6）。ヒトゲノムのcDNAライブラリーのスクリーニングの結果、クローンOK-1が分離されるに至った（図6）（SEQ ID NO. : 6）。ラムダGT10の2つのEcoRIクローニングサイトの1つが、ライブラリー筛选の結果、除去されたことが判明したので、cDNA断片及び3' kb（左）ラムダアームの~250bpを含むpGd111/EcoRIファージ断片をpCDNA1の位置する3'末端にサブクローニングした。DNA配列決定の結果、クローン化されたcDNAは、3'コーディング領域の~1000bpと、Aの多い3'末端を含む3'非コーディング領域の~200bpを含むことが判明した。XhoI部位に於ける5'前コーディング領域は、次いでライブラリーを再スクリーニングするために使用され、クローンOK-2の分離を得たが、これは、pCDNA1へのサブスクリーニング後、コーディング領域の~1400bpを含むことが判明した。ライブラリーの第三のスクリーニングに対しては、OK-2のPvuII/PstIが用いられた。分離されたクローンOK-3はOK-2と同一であることが判明した。ゲノムライブラリーのスクリーニング（~10<sup>6</sup> pfu）の結果、4つの独立したクローンを分離された。これらのクローンの制限酵素消化産物のサザンブロット分析を正常ゲノムDNAのそれとの比較した結果、1つの15kbのゲノムクローン、HPC1（また、HPC4とも呼ばれる）は、SalIで消化された正常ヒトゲノムDNAからの、ハイブリッドを用いるヒトDNAと同一サイズのSseI/SacI断片を含むことが判明した（下記参照）。3' SalI/SacI断片を構成するハイブリッドを形成する2.3kbのSseI/SacI cDNA断片と、~8kbのXhoI断片は、共にpCDNA1にサブクローニングされた。さらにSseI/SacI cDNA断片のサザンブロット分析の結果、ある~1000bpのBamHI/SacI断片がヒトのPTH/PTHrPレセプターの一部をコードしており、これが、後述の遺伝的シグナルペプチドと~1000bpのイントロンによって中断されている5'非コーディング領域をコードしているメチオンを代表していることが判明した（図7）。

コーディング領域の後、~450ヌクレオチドを分離するために、ヒトゲノムからのポリ（A）+RNAをH12マブライジングの後、消化した（図7）。1本融合塩基。2つの独立したPCRを以下の2つの別個の正方向プライマーを用いて行った：1）2つの別個にクローン化されたPTH/PTHrPレセプター、OK-1とOK-2の5'非コーディング領域に基づく逆転写プライマーOK-1、及び、2）5'非コーディング領域の逆転写プライマーOK-2である。OK-2が両方の逆転写プライマーとして用いられた。サザンブロットおよび制限酵素分析によって、ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている増殖されたDNAの予想されたサイズが確認された。ヒトのPTH/PTHrPの5'末端をコードしている正常細胞のPCR産物は、後述

されたEcoRV部位を用いてpCDNA1にクローン化された。5'PCRクローンの配列分析によって、これらの5'ヌクレオチドの塩基は正方向プライマーの配列の違いによることが確認されたが、それ以外は同一の配列であることが明らかとなった。ヒトのPTH/PTHrPレセプターcDNAの両側のヌクレオチド配列決定により、593アミノ酸残基を持つ蛋白質をコードしている領域が明らかとなった（図6, SEQ ID NO. : 4）。

完全長のヒトゲノムのPTH/PTHrPレセプターcDNA、HCRkは、PCRクローンOK-2とOK-2のBamHI/PvuII断片を用いて構成された。ヒトのPTH/PTHrPレセプターをコードしている完全長のcDNAを用いて、ヒトゲノムとHPC2細胞からのゲノムDNA（~10kb/レーン）のノーザンブロット分析の結果、~2.3kbの1つの主要なハイブリッドを形成するDNA帯が明らかになった（図19）。正常のヒトゲノムDNAのXhoI消化物は、同じ完全長のcDNA（図20）でマブプロブされること、1つの主要な約2.3kbのハイブリッドを形成するものと、約1kbのハイブリッドを形成するものと2つのDNA帯が現れた。これらのデータは、ヒトのPTH/PTHrPレセプターが単一の遺伝子の産物であることを示唆している。完全長のクローンは、次いで、遺伝的及び生物学的特性を調べるため、上掲の方法によりCOS細胞に一過性に発現された。

ヒトのレセプターのオリガヌム質のPTH/PTHrPレセプター及びラットのPTH/PTHrPレセプターとの比較により、表4、81%と91%のアミノ酸配列の同一性が明らかになり、結果として非常に類似した加水分解プロットを示した（図8）。すべての細胞系システムは、遺伝的シグナルペプチドにおける2つのシステイン残基を含み、すべての可能性のある細胞のN-糖糖化部位のように、保存されている。ヒトのゲノムとラットのPTH/PTHrPの間で同一でないアミノ酸のいくつかは、ヒトとラットのレセプターの間では保存されていることが判明した。これらの保存されているアミノ酸配列は、51位のArgからHis、58位のArgからPro、262位のArgからHis、358位のAspからHis、422位のIleからThr、及び、427位のThrからLeuである。

特表平6-506598 (10)

## 生物学的活性質の検出

オキザムとラットのPTHrP/PTHrPレセプターの生物学的性質の遺伝的変異の検出は一過性に導入されたCOS細胞において、放射線リガンドとして<sup>125</sup>I-PTHrPと<sup>125</sup>I-N1ePTHrPの両方を用いるラヂオレセプターアッセイにより、また、リガンドによるcAMPの蓄積、細胞内遊離カルシウムの増加、及びイノシトールリン酸代謝の促進を測定するバイオアッセイにより、上記の方法によって行われた。

図9はOK-Hを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、無極のPTHrP(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ)PTHrP断片が結合の結合阻害剤として用いられた場合、PTHrPの結合が阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-N1ePTHrPの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHrPとPTHrPが共にOK-Hによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図10は、OK-Hを発現しているCOS細胞が、N1ePTHrPに結合すると細胞内の遊離カルシウムの濃度を増大するが、OK-HあるいはR15Bレセプターを発現しない(図12と図14)、N1ePTHrPで刺激されているCOS細胞と比べると、増加は低減が低い(平均 $\pm 3.9nm$ )、あるいは全く低いことを示している。OK-HあるいはR15Bを発現しているCOS細胞とは異なり、OK-Hを発現しているCOS細胞はN1ePTHrPで刺激された時、イノシトールリン酸代謝の増加は検出されない(図15)。

図11はOK-Oを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無極のPTHrP(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ)PTHrP断片が

結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-N1ePTHrPの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHrPとPTHrPが共にOK-Oによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図12はOK-Oを発現しているCOS細胞が、N1ePTHrPとPTHrPによる刺激後、細胞内の遊離カルシウム濃度及びイノシトールリン酸代謝を増大することを示している(図13)。

図13はR15Bを発現しているCOS細胞が、<sup>125</sup>I-PTHrPを結合することを示している。これらのデータは、また、PTHrPの結合が、無極のPTHrP(1-34)、またはアミノ末端で修飾されている(即ち、3-34及び7-34断片体、これらは8位と15位にメチオニンの代わりにN1e断片を、そして34位のフェニルアラニンの代わりにチロシン置換を持つ)PTHrP断片が結合の結合阻害剤として用いられた場合、阻害されることを示している。同様に、OK-Hを発現しているCOS細胞への<sup>125</sup>I-N1ePTHrPの結合は、PTHrPあるいはPTHrP断片が結合阻害剤として用いられた時、阻害された。これらのデータは、PTHrPとPTHrPが共にR15Bによってコードされているレセプターに結合することを示唆している。

図14は、R15Bを発現しているCOS細胞が、OK-Oを発現しているCOS細胞が刺激された場合と同程度に細胞内カルシウム濃度を増大することを示している。

図15は、R15BあるいはOK-Oを発現しているCOS細胞が、N1ePTHrPあるいはPTHrPによる細胞の刺激後、イノシトール三リン酸(IP<sub>3</sub>)とイノシトール二リン酸(IP<sub>2</sub>)の蓄積の急速な増加によって証明されるように、フォスファジイノシトールの加水分解速度を増大することを示している。さらに、OK-Hを発現しているCOS細胞は、N1ePTHrP、あるいはPTHrPによる刺激後、イノシトール三リン酸とイノシトール二リン酸の蓄積に似る増加も検出出来なかった。これらのデータは、R15BとOK-OによってコードされているPTHrPレセプターはホスホリパーゼCに、恐らくG<sub>i</sub>を介して共

役していることを示唆する。OK-OとOK-Hの間の唯一の違いはC末端配列にあるので、これらのデータはOK-OとR15BによってコードされているPTHrPレセプターのC末端はホスホリパーゼCの活性化に関与していることを強く示唆する。

図16は、R15BとOK-Hを発現しているCOS細胞が、N1ePTHrPによる刺激後、cAMPの蓄積を増大することを示している。同様の結果は、OK-Oを発現しているCOS細胞においても得られた。cDNAライブラリーのみを導入されたCOS細胞ではcAMPの蓄積は認められなかった。これらのデータは、アデニル酸シクラーゼに共役しているPTHrPレセプターは、レセプターのC末端の細胞質側の完全長の配列を必要としないことを示唆している。これらのデータは、OK及びR15B細胞のcDNAライブラリーのスクリーニングからクローニングされた3つのPTHrP/PTHrPレセプターのすべてが、同ペプチドのアミノ末端リガンドを同等に結合することを示唆している。リガンドによるこれらのすべてのレセプターの活性化は、アデニル酸シクラーゼを、恐らくはG<sub>i</sub>タンパク質と結合したG<sub>i</sub>タンパク質の1つの活性化を通じて、刺激する(細胞内cAMPの増加によって測定されるように)。G<sub>i</sub>タンパク質は、三量体ペプチド結合を持つ。そのうち、サブユニットの1つ、アルファは、大々、別個であるが、他の2つ、ベータとガンマは同一か、または同源性が高い。これらG<sub>i</sub>タンパク質の1つ、(G<sub>i</sub>)はG<sub>i</sub>-アルファサブユニット(「刺激性」G<sub>i</sub>-アルファサブユニット)を含み、これはアデニル酸シクラーゼの活性化に関与する。

リガンドのOK-Hへではなく、OK-OとR15Bへの結合もまた、細胞内の遊離カルシウムを増加してイノシトールリン酸代謝の刺激を誘発する。これらの結果は、OK-OとR15Bレセプターのリガンドによる活性化は、共に第2の細胞内エフェクター、ホスホリパーゼCの刺激をもたらすことを強く示唆している。これら活性化されたレセプターとホスホリパーゼCとの共有配列は、G<sub>i</sub>とは全く異なるG<sub>q</sub>タンパク質であるらしい。対照的に、カルボキシ末端で切り込まれている活性化されたOK-Hレセプターは、活性化された時のその構造が、ホスホリパーゼCを活性化しないか、あるいはホスホリパーゼCを効果のない活性化をする可能性がある。

PTHrP/PTHrPレセプターのカルボキシ末端部の生化学的配列は、既知としてR15Bを、そして481位に終止コドンに導入された上流プライマーとを用いる標準PCR法により、カルボキシ末端短縮クローンレセプターを産生することによって、さらに決定された。同時に述べると、上流プライマーはラットcDNA配列(図3: SEQ ID NO. 13を見よ)の1494-1513番のアミノ酸に基づく合成オリゴヌクレオチドで、これは終止コドンとXbaIクロニング部位が追加されたものであった。30例のPCRサイクルが行われ、各サイクルは変性92℃、1分; アニリング60℃、1分; 延伸72℃1分からなっていた。生成物はNsiIとXbaIによって切断され、ゲル電気泳動によって精製された。R15Bは、XbaIとNsiIによって断片化され、精製されたPCR生成物は、次いで、XbaI-NsiIで切断されたR15Bベクターに連結された。その結果得られたプラスミド、R48Bは細胞内で増殖され、配列が決定された。

R48Bは、591アミノ酸残基を持つレセプター中のものと同一480のアミノ酸をコードしている。この配列はcDNAはCOS-7(一過性発現)とC<sub>2</sub>H1210細胞(安定発現)に発現された。産生レセプター、R48Bと自然型レセプター、R15Bを発現しているCOS-7とC<sub>2</sub>H1210細胞は共にPTHrP(1-34)を同等の親和性を持って結合する。活性化されると、R48Bは、正常型レセプターと同様にCOS-7とC<sub>2</sub>H1210細胞におけるcAMPの蓄積を刺激した。正常型レセプターとは対照的に、R48BはPTHrPで刺激された時、COS-7細胞、あるいはC<sub>2</sub>H1210細胞にも[C<sub>2</sub>']イオンの増加を介しなかった。これらのデータは、PTHrP/PTHrPレセプターによるホスホリパーゼCとアデニル酸シクラーゼの活性化に対する分子的要因性は互いに異なっていることを示唆し、PTHrP/PTHrPレセプターのカルボキシ末端部のホスホリパーゼCとの、しかしアデニル酸シクラーゼではない、活性における互異な役割を指摘している。最後に、活性化されたPTHrP/PTHrPレセプターが適切なG<sub>i</sub>タンパク質および/または細胞内のエフェクター分子を活性化する可能性もまたある。

クローニングされた3つのPTHrP/PTHrPレセプターを導入されたCOS-7細胞の分析によって、放射線PTHrP(1-34)とPTHrP(1-36)





## 特表平6-506598 (12)

期間、いずれか長い方の期間、生存状態で、汚染されないように生存を継続する。中絶者の指定代理人は、もし、荷役物の状態のために、監視があっても荷役物が汚染を発生出来ないならば、荷役物を取り替える責任のあることを認める。

## ポリペプチド

本発明によれば、ポリペプチドには、例3-3及び6に示す、示されているオボニン、ラット及びヒトの前甲状腺ホルモンレセプター、及びいかなる他の組織に存在するレセプターにせよ、これらのレセプターをクローニングして発現させるのに用いられたものに類似の方法により、あるいは、ここに記述されている配列の1つの全体または一部をプローブとして利用する方法によって生成されるものを含む。さらに、前甲状腺ホルモン、または前甲状腺ホルモン関連蛋白質に対する結合性のあるPTHレセプターの類似体あるいは断片も本発明の範囲内にある。

特定の特殊なレセプター類似体には、前甲状腺ホルモン受容体によってのみ異なる。例えば、同じクラスの他の代わりに1アミノ酸の置換（例えば、グリシンの代わりにバリン；セリンの代わりにアルギニン、等）、あるいは、1つ、またはそれ以上の非同義アミノ酸の置換、欠失、または前甲状腺ホルモン、または前甲状腺ホルモン関連蛋白質に結合するレセプターの能力を破壊しない位置にされた挿入によってのみ異なるアミノ酸配列を持つ完全長、あるいは部分長のレセプター断片が含まれる。

特に関心のある特殊なレセプター断片には、これらに限られるわけではないが、レセプターの部分で、一次アミノ酸配列からChou-Fasman法（例えば、Chou and Fasman, *Adv. Rev. Biochem.* 47: 251, 1978参照）のような疎水性/親水性計算法を用いて加算外であると推定されたものが含まれる。親水性ドメイン、特に少なくとも10個のアミノ酸からなる疎水性区間（参照、異性ドメイン）は、細胞外ドメインの能力を破壊するとして現れて来る。図31は、1つのPTHレセプターの細胞外、細胞内及び細胞ドメインの手配される配置を示している。

特定のPTHレセプター断片の例には、以下Bクローニングの遺伝子アミノ酸配列に由来する以下のアミノ酸配列（括弧の文字記号で示されている）が含まれ

ている：

## 細胞外ドメイン：

RP-1: TNETREAREVFDRLGHITYVC (SEQ ID NO. : 5)  
 RP-2: VLEYSGFTLDEAEELTSEEL (SEQ ID NO. : 6)  
 RP-3: VTFFLYFLATNYYWILVEG (SEQ ID NO. : 7)  
 RP-4: Y-RATLANTGCDCLESGQHKWIIQVP (SEQ ID NO. : 8)  
 RP-5: PYTEVSGTLWQIQMHYEM (SEQ ID NO. : 9)  
 RP-6: DDVFTXESQIFLLHRAQA (SEQ ID NO. : 10)

## 細胞内ドメイン：

RP-7: FRRLNCTRYN (SEQ ID NO. : 11)  
 RP-8: EXKYLWGFTE (SEQ ID NO. : 12)  
 RP-9: VLATKLRBTNAGREDTRQQYRKLK (SEQ ID NO. : 13)

これらの断片はKusmannらの方法（*Endocrinology* 117: 1230, 1984）によって合成され、HPLCによって精製された。ポリペプチドの発現

本発明によるポリペプチドは、本発明の細胞レセプターの一部または全体をコードしている配列を持つ組織培養細胞から、なにか適切な発現系、例えば、適切な宿主細胞（原核あるいは真核）の、適切な発現媒体（例、pCDNA1）内の発現状態による発現装置を用いて、発現することにより生成することが可能である。正確にいかなる細胞を用いるかは、本発明にとって重要ではない。しかしながら、本発明のポリペプチドがPTH/PTHrPレセプターの全体または一部

を含む場合には、以下の宿主細胞が好適である。COS細胞、SH-PTK1細胞、OK細胞、AET20細胞、及びCHO細胞。移入の方法及び発現産物の選択は適切な宿主系に依存する。細胞系への移入の方法は、例えば、Abe et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989)に記載されており、発現産物は、例えば、Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P. H. Puvion et al., 1985, 編著, 1987)に記述されているものから選んでもよい。安定に移入された細胞は、レセプターDNAを宿主細胞の染色体に組み込むことによって作ることが出来る。適切なDNAは、pCDNA, pCDNA1-Neo, あるいは他の適切なプラスミドに挿入され、次いで、細胞は、このプラスミドにより、pSV-2-Neo, あるいはpSV-2-DHFRとの共同移入をして、あるいはしないマウス細胞が、ガンチカルウム、及び/あるいはDME/デオキサン誘導体によって移入される。移入された細胞の選択は、薬物的に上昇するレベルのG418 (Geneticin, G418)で、そしてもし必要ならば、ノトトレキサートを用いて行われる。

本発明のポリペプチドをコードしているDNA配列は、また、宿主細胞内にも発現することが出来る。細胞レセプター、あるいはレセプター断片をコードしているDNAは、細胞内発現における発現をもたすこと出来る例外的な細胞に発現可能な細胞に導入されたベクター上を運ばれる。もし細胞ならば、コーディング配列は、その5'-末端に、発現される蛋白質の宿主細胞の細胞膜への分泌をもたらす、それによって蛋白質の回収とその後の分泌を容易にすることの出来る細胞のシグナル配列をなにかコードしている配列を含むものと出来る。最も頻りに用いられる細胞膜透過性配列は、例3-3の配列である。しかし、他の細胞膜透過性配列もまた使用してよい。プラスミドベクターは、選択的、可逆的のマーカ、及び宿主細胞に適合する例に由来する制限配列を含むものを用いられる。例えば、E. coliは、pBR322、これはBollivar et al. (*Gene* 2: 95, 1977)によって、3つの制限酵素に消化するプ

ラスミド、そのうち2つはSalmonellaの株から、1つはE. coliから分離されたものであるが、に由来する断片を用いて合成されたプラスミドであるが、その構造を用いて複製することが出来る。pBR322は、アミノペプチド及びテトラサイクリン耐性遺伝子の両方を含み、そのため、希望する発現ベクターの構築において、提供され、あるいは破壊される多岐の選択可能なマーカーを提供する。一般に用いられる細胞膜透過性配列（また、「細胞因子」とも呼ばれる）は、ここでは、助発的にオペレーター、リボソーム結合部位配列と共に、転写開始のためのプロモーターを含むものと定義される。転写の発現を指示するため一般に用いられるプロモーターには、ラムダー由来のP<sub>L</sub>プロモーター及びSV40-100転写リボソーム結合部位 (Simalak et al., *Nature* 292: 128, 1981)ばかりでなく、β-ラクタマーゼ（ベニリナーゼ）、ラクトース (lac) (Chambers et al., *Nature* 198: 1096, 1977)及びトリプトファン (Trp) プロモーター系 (Goodell et al., *Nucl. Acids Res.* 2: 4057, 1980)も含まれる。

本発明の細胞レセプター蛋白質は、以下のような性質を持っているので、細胞内に発現すると、それは細胞膜へ、部分的には膜を貫通して移動し、その結果、その一部は膜に埋め込まれて止まり、一部は細胞内に伸張り、一部は細胞内に止まる。このような埋め込まれた細胞レセプターを持つ細胞膜に埋め込まれた細胞は、それ自身、本発明の方法の中で用いられるとよく、あるいは、レセプター蛋白質は膜から抽出され、精製されることも可能である。

細胞の蛋白質を細胞膜に固定させる方法を行う蛋白質の疎水性部分を欠くベクター断片は、発現しても、膜に埋め込まれることは期待されない。これらが細胞内に止まるか、あるいは細胞外に分泌されるかは、分泌を促進する配列（例えば、シグナルペプチド）が含まれているか、否かによる。もし、分泌されれば、本発明のポリペプチドは細胞外から回収することが出来る。もし、そうでなければ、細胞は解体して、例外的なポリペプチドは細胞の全内容物から分離されなければならない。発現される可能性のあるポリペプチドの構築例は、図示しないが、以下のものが含まれる。

抄表平6-506598 (13)

1) 図3に示されるようなラットの骨のPTB/PTH、プレサチン、胎仔リーダー配列を含む、7:10歳1-192からなる7:10米飯部分。

2) 図3に示されるようなラットの骨のPTn/PTdのプレブターの、恒  
定リーグ-産卵を除外した、アミノ酸27-192からなるアミノ酸混合物。

3) 図3に示されるようなラットの骨の完全長のPTH/PTHrPレセプタ

4) PR-1 (主記のふりな)。

5) PR-2 (上記の点のうち) 。

本発明のポリペプチドは、アフィニティクロマトグラフィーを用いて容易に精製することが出来る。これらのポリペプチドの活性、あるいはレセプター特異的リガンド（例、P2H/PTHセファロースに対するキルモンチンBとP2H1P）は、セファロース 4 CNB1-活性化セファロース（ $\text{pH} \approx 8.0$ ）のような固相支持体に共有結合し、本発明のポリペプチドをなんらかの結晶剤と共に分離するのに用いてもよい。一般的には、1mgのタンパク質あたり約4mgのセファロースで活性化されたセファロースと4で17-20時間（室温下）インキュベートされる。セファロースは、3MTM塩酸（ $\text{pH} 8$ ）で洗脱して過剰の酸性部位をブロックする。セファロース-P2H、セファロース-P2H1P、あるいはセファロース-抗体は、次いで、粗製ポリペプチドと迅速反応塩酸（ $\text{pH} 7.4$ ）中、4で2時間インキュベートされる（室温下）。セファロースは、次いで、一般的にはカラムに充填され、急にPB5で洗脱され（一般的にはカラム長の10倍）、水で希釈した塩酸（ $\text{pH} 1.85$ ）で洗出される。洗出液は、次いで、凍結乾燥により濃縮され、その純度は、例えば、凍結乾燥で検査される。

**抗細胞レセプター抗体**

本発明の照臨レセプターあるいはレセプター断片は、専門家にはよく知られて  
いるにもかかわらず適宜の方法によって、マイクロナール抗体を生成する方法、及びミ  
クロナール抗体を生成する方法を企め、抗体を生成するものに用いることが出来る。  
即ち、P IIレセプターの塩基アミノ酸配列は、他の自己免疫疾患レセプター  
に免疫された鼠に接種した照臨アミノ酸配列と認められる領域(図2を見よ)。

いは1%ベツフォルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡法で検閲された(もし、F17C-標本の第二抗体が得られた時)。

抗体を生成するもう1つの方法は、抗原として細胞(例えば、セプターをコードしているDNAを移入されたマウスの細胞のような哺乳類の細胞)の表面に発現されている本発明の価価の細胞セプター-蛋白質を利用する。このような細胞は、通常、例えば、DnA-E-デキストラン等入浴により、細胞セプターの産出の発現をコードし、置つ、結合することの出来るペプターを得て生成することが出来る。例えば、DnA-E-デキストランに特定のモノクローナル抗体は以下の方法で生成される。

ラットの組織でPTMレセプターを細胞表面に自発に発現している細胞のCD5細胞をSantobar-Cマウス(Chorley's River Laboratory, Wilmington, MA)の腹腔内(IP)に注射する。マウスは4週ごとにIP注射により追加免疫を受け、融合の3日前に、鼻内(IV)追加免疫により再免疫される。このマウスから脾臓細胞を分離し、モノクローナル細胞と融合により融合する。ハイブリドーマは、毎週のヒヤネサン/アミノプリン/ネオチン(HAT)槽地で選択的に筛选と選別される。PTMレセプターを産生する抗体を分泌するハイブリドーマは、食物、細胞あたりPTMレセプターのコピーを元素量に免疫する組織液(PS17/2、あるいはOK細胞)で、通常の免疫の技法を用いてスクリーニングして確認される。PTMレセプターに結合することの出来る抗体を生成するこれらのハイブリドーマは培養して、サブクローニングされる。次いでモノクローナル抗体の性質を頻りに検出するために、ラポレセプター及びモノクローナル抗体を用いる二次スクリーニングを行うことが出来る(以下参照)。

⑤TDRレセプター・アングゴニスト及びアゴニストのスクリーニング

本発明のホリペプチド及び飲料ならびに他の化合物は、PT日経合資、及びア  
ンタゴニスト的あるいはアゴニスト的な性質について、ここに記載のッセイを  
用いてスクリーニングすることが出来る。

1) 肉をあげると、無塩の細胞上の PTH レセプターを認識するこれらの試みは、PTH あるいは PTHrP と PTH Ⅲ / PTHrP レセプターへの結合に対し融合

を塩化ニッケルと硫酸の両端（即ち、昇水性）ドメインを跨つとせられる蛋白質質点を示している。この情報は、レオプター蛋白質の、細胞外に露出している部分のみがあり、従って  $\alpha$  及び  $\beta$  の位置に提示されるであろう領域の選択を手引とするのに用いることが出来る。このような領域の1つ、あるいはさらに多くを表現する短いペプチドを合成し（例えば、化学的に、あるいは総合成DNA技術により）、ポリクローナル、あるいはモノクローナル抗体を産生するために発用（例えば、ウシや、あるいはマウス）を免役するののに用いることが出来る。例えば、上記のR P T N は、レオプターのペプチドのあるもの（R P-1、R P-5、及びR P-6）は、免疫の誘致を用いて化学的に合成され、以下の手順によりウサギにポリクローナル抗体を産生するのに用いられた。

完全フロイントアジュバントで乳化された所定のペプチドの製品をウナズに袋内に充填する。追加剤は、不活性あるいは完全アジュバントで、2ヶ月間隔で注射される。

抗体価は2つの方法のいずれかを用いて測定される。第一に、抗体を1%正相ウツギ能で遊離させ、<sup>125</sup>I-標識PTxH/PTxH/プレセプター断片と反応(例えば、Segro et al., 上記)により24時間、4℃でインキュベーションする。結合した<sup>125</sup>I-標識PTxH/PTxH/プレセプター断片は、升結合のものから、100μlの標記抗体(抗ウツギ IgG, Sigma)を20倍に希釈したもの及び1mlの5%ポリニレングリコールを加え、4℃で、2000rpmで30分、4℃で凍結することによって分離される。上清を除去し、ペレットをカウンタで、放射能性の分析をする。第二の方法では、自家製の(例えば、ROS 17/2.8、Ox、S405-2細胞)あるいは組換え(例15B、OK-OあるいはOK-B)を移入されたCOS細胞あるいはC2H1210)PTxH/PTxH/プレセプターを発現している細胞系が、遊離させた抗体と4℃、20℃、あるいは37℃で1-4時間インキュベートされる。細胞をPBSで(3回)洗浄し、<sup>125</sup>I-標識(NB6、Dupont)あるいはFITC-標識(Sigma)の第二抗体と2時間、4℃でインキュベートする。洗液(1PBSで3回)、細胞は0.1MNaOHで希釈してカウンタで測定される(もし、<sup>125</sup>I-標識の第二抗体が用いられた時)、ある

する係力についてスクリーミングされる。細胞表面にPTDレセプターを発現している細胞は、<sup>125</sup>I-PTD巨細胞膜でも、<sup>125</sup>I-NIとPTDがあるいは<sup>125</sup>I-PTDとPTDと、試料のポリクローマルあるいはモノクローマル抗体の存在下、4時間、15°Cでインキュベートされる。使用される抗体は、電析処理、細胞処理、あるいは製氷保存のものか、あるいは凍結乾燥したものである。インキュベーション後、細胞は結合緩衝液（例えば、生理食塩水）で洗淨、細胞は、ガンマカウンターを用いて放射能を定量的に分析される。PTDレセプターへのPTDと細胞膜の結合を阻害する抗体は、融合時、滅菌しないものは非融合時と分離される。

錠状及び棒状の両方を含む。化合物は、それらのアゴニストあるいはアンタゴニストとしての性質につき、上記のcAMP産生、細胞内カルシウム、及び/あるいはイノシトール三リン酸のアクセシを阻害してスクリーニングすることが出来る。如斯く表面上にPTIIレセプターを発現している動物は、PTII、PTIIレセプター-抗体、あるいは抗体を組み合わせるものと、30mM BMX (3-イソブチル-1-メチルキネテンン、31g/mol、Sigma, Louisville, MO)の存在下、5-60分間、37度でインキュベートされる。イタリックAMPの産生は、上述のように、特異的ラジオイソトープアクセシによって測定される。PTIIレセプターへの結合に対してPTIIと競合し、且つ、PTIIのcAMP産生に対する効果を阻害する化合物は、競合的PTIIアンタゴニストと見做される。反対に、PTIIレセプターへのPTIIの場合と競合しないが、なお、PTIIによるcAMP産生促進を阻害する(少なくとも、レセプター活性化部位を妨害することにより)化合物は、非競合的アンタゴニストと見做される。PTIIレセプターへの結合に対しPTIIと競合し、PTIIの存在あるいは非存在下にcAMPの産生を制御する化合物は競合的アゴニストである。PTIIレセプターへの結合に対してPTIIと競合しないが、PTIIの存在あるいは非存在下に、なお、cAMP産生を制御する能力があるか、あるいはPTII単独によって観察されるよりも高い効果を利用する化合物は、非競合的アゴニストと見做される。

### 使用例

本発明のポリペプチド、塩、及び他の化合物は、本発明の組換えレセプターと



特表平6-506598 (45)

ターからPTHレセプターを発現するように工作された。このような動物は、高いカルシウム含量と、純粋でより固い殻を持つ卵を産むことが期待される。

#### 他の実施例

他の実施例は、以下の特許請求の範囲内にある。例えば、本発明の装置には、トリ、あるいは有袋類、げっ歯類、または人間のような哺乳類を含むいかなる哺乳動物種にせよ、これらから本発明された遺伝子、あるいはcDNAあるいはRNAを含む。オボソウム、ラット、及びヒトのような多様な動物種からのPTHレセプターに対して証明された高度の相同性は、ここに開示されたPTHレセプターの分離方法が、多様な動物種からの同定した単阻レセプターの分離に広く適用されることを示唆している。

#### DNA及びアミノ酸配列のコンピュータ解析

##### (1) 一般情報

(i) 申請者      Segre, Gino V.  
Kornenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abddul-Badi  
Juppner, Harold  
Polite, John T., Jr.  
Schifano, Ernestina

(ii) 発明の名称      副甲状腺ホルモンレセプター及びこれをコードしているDNA

(iii) 配列の長さ      3

(iv) 送信住所

(A) 発信者      Fish & Richardson  
(B) 通り      225 Franklin Street  
(C) 市      Boston  
(D) 州      Massachusetts  
(E) 国      U. S. A.  
(F) 郵便番号      02110-2804

(v) コンピュータのハードウェア

(A) 媒体タイプ: 3.5" ディスケット、1.44メガビット記憶容量  
(B) コンピュータ: IBM PS/2 モデル 302あるいは55X  
(C) 作業系: IBM P. C. DOS (バージョン3.30)  
(D) ソフトウェア: ワードパーファクト (バージョン 5.0)

(vi) 発出の申請データ:

(A) 申請番号:      07/631,702  
(B) 提出日時:  
(C) 分類:  
(vii) 以前の申請データ  
(A) 申請番号:      07/631,702

(B) 提出日時:

(viii) 代理人/代理事務所:

(A) 姓名:      Paul T. Clark  
(B) 登録番号:      30,162  
(C) 協会/証明番号:      00786/071003  
(ix) 連絡先情報:  
(A) 電話:      (617) 542-3070  
(B) テレファックス:      (617) 542-8906  
(C) テレックス:      200154

(2) 配列番号: 1 に対する情報。

(i) 配列の特性:

(A) 長さ:      1862  
(B) タイプ:      核酸  
(C) 鎖の状態:      2本鎖  
(D) トポロジー:      線状

(x) 配列の記法: SEQUENCE ID NO: 1:

```

TGGGACAGC CAGGCTCTG CTAGTCCAG GCGGAGGCA CCGAGTGGG ATG)CAGCTG 60
GCGGAGGCT TGGGAGTGGG CCGGAGGAG GCGGAGGAG AGC GAG GCG GCG GCG ATC 120
                                     AGC GAG AGC AGC AGC AGC
                                     1
101 CAG AGC CTT GCG TTT CTC CTC TGC TGC TGC GTC GTC AGC TGC GTC 180
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
                                     15
201 CAG CTT GCG GAG TGC CAG CAG CTC ATA AGC AGC CAG GAG CAG AGC 240
Tyr Ala Leu Val Val Ala Asp Asp Val Phe Thr Tyr Gln Gln Gln Val
                                     25
301 CTT CTC GCG AGC CCG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 300
Ile Leu Leu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
                                     40
401 CTT CTC GCG AGC CCG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 360
Val Leu Arg Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val
                                     55
501 CTT CTC GCG AGC CCG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 420
Arg Ser Ala Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
                                     70
601 CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 480
Gln Ala Gln Gln Ser Arg Gln Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Cln Arg
                                     95
701 CCG TCG TCG CTA CTT GAG TGC GAG AGC ATY GTC TGC TGC CTT GTC GCA 540
Gly Ser Cys Ser Pro Gln Trp Asp Arg Arg Phe Val Cys Trp Pro Ala Gln
                                     110
801 CCG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 600
Val Phe Gln Tyr Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val Val
                                     125
901 CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG 660
Phe Arg Cln Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
                                     140

```

## 特表平6-506598 (16)

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 | 788 | 789 | 790 | 791 | 792 | 793 | 794 | 795 | 796 | 797 | 798 | 799 | 800 | 801 | 802 | 803 | 804 | 805 | 806 | 807 | 808 | 809 | 810 | 811 | 812 | 813 | 814 | 815 | 816 | 817 | 818 | 819 | 820 | 821 | 822 | 823 | 824 | 825 | 826 | 827 | 828 | 829 | 830 | 831 | 832 | 833 | 834 | 835 | 836 | 837 | 838 | 839 | 840 | 841 | 842 | 843 | 844 | 845 | 846 | 847 | 848 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 854 | 855 | 856 | 857 | 858 | 859 | 860 | 861 | 862 | 863 | 864 | 865 | 866 | 867 | 868 | 869 | 870 | 871 | 872 | 873 | 874 | 875 | 876 | 877 | 878 | 879 | 880 | 881 | 882 | 883 | 884 | 885 | 886 | 887 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 895 | 896 | 897 | 898 | 899 | 900 | 901 | 902 | 903 | 904 | 905 | 906 | 907 | 908 | 909 | 910 | 911 | 912 | 913 | 914 | 915 | 916 | 917 | 918 | 919 | 920 | 921 | 922 | 923 | 924 | 925 | 926 | 927 | 928 | 929 | 930 | 931 | 932 | 933 | 934 | 935 | 936 | 937 | 938 | 939 | 940 | 941 | 942 | 943 | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 950 | 951 | 952 | 953 | 954 | 955 | 956 | 957 | 958 | 959 | 960 | 961 | 962 | 963 | 964 | 965 | 966 | 967 | 968 | 969 | 970 | 971 | 972 | 973 | 974 | 975 | 976 | 977 | 978 | 979 | 980 | 981 | 982 | 983 | 984 | 985 | 986 | 987 | 988 | 989 | 990 | 991 | 992 | 993 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 | 999 | 1000 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

(2) 配列の記述: 2 に列する情報:

(1) 配列の記述:

(A) 長さ: 1863

(B) タイプ: 核酸

(C) 塩の状態: 1本鎖

(D) 1863 = 1863

(x1) 配列の記述: SEQUENCE ID NO: 2:

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 | 788 | 789 | 790 | 791 | 792 | 793 | 794 | 795 | 796 | 797 | 798 | 799 | 800 | 801 | 802 | 803 | 804 | 805 | 806 | 807 | 808 | 809 | 810 | 811 | 812 | 813 | 814 | 815 | 816 | 817 | 818 | 819 | 820 | 821 | 822 | 823 | 824 | 825 | 826 | 827 | 828 | 829 | 830 | 831 | 832 | 833 | 834 | 835 | 836 | 837 | 838 | 839 | 840 | 841 | 842 | 843 | 844 | 845 | 846 | 847 | 848 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 854 | 855 | 856 | 857 | 858 | 859 | 860 | 861 | 862 | 863 | 864 | 865 | 866 | 867 | 868 | 869 | 870 | 871 | 872 | 873 | 874 | 875 | 876 | 877 | 878 | 879 | 880 | 881 | 882 | 883 | 884 | 885 | 886 | 887 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 895 | 896 | 897 | 898 | 899 | 900 | 901 | 902 | 903 | 904 | 905 | 906 | 907 | 908 | 909 | 910 | 911 | 912 | 913 | 914 | 915 | 916 | 917 | 918 | 919 | 920 | 921 | 922 | 923 | 924 | 925 | 926 | 927 | 928 | 929 | 930 | 931 | 932 | 933 | 934 | 935 | 936 | 937 | 938 | 939 | 940 | 941 | 942 | 943 | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 950 | 951 | 952 | 953 | 954 | 955 | 956 | 957 | 958 | 959 | 960 | 961 | 962 | 963 | 964 | 965 | 966 | 967 | 968 | 969 | 970 | 971 | 972 | 973 | 974 | 975 | 976 | 977 | 978 | 979 | 980 | 981 | 982 | 983 | 984 | 985 | 986 | 987 | 988 | 989 | 990 | 991 | 992 | 993 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 | 999 | 1000 |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

時表平6-506598 (17)

[illegible][illegible]

(2) 配列確認番号: 3 に関する情報

(1) 配列の位置：

(A) 長さ: 2051  
 (B) タイプ: 複線  
 (C) 納め状態: 2本絞  
 (D) トロロジ: 無絞

(x i) 配列の記述: SEQUENCE ID NO: 3;

|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 0000000000 | 40   |
| 1234567890 | 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 168  |
|            | 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         |      |
|            | 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 150  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 200  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 250  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 300  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 350  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 400  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 450  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 500  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 550  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 600  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 650  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 700  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 750  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 800  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 850  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 900  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 950  |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |
| 0123456789 | 0234567890 | 0345678901 | 0456789012 | 0567890123 | 0678901234 | 0789012345 | 0890123456 | 0901234567 | 1012345678 | 1000 |
| 01         | 02         | 03         | 04         | 05         | 06         | 07         | 08         | 09         | 10         |      |
| 1          | 2          | 3          | 4          | 5          | 6          | 7          | 8          | 9          | 10         |      |
|            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |      |

CTR CTR SMO TGO GAC HMC APC QTT TCU TCU OCA TZA OGG ECA OCA QST  
 Lwu Czo GLo Tzp Asp Aen 111 Val Cys Tsp Pzo Lzo GYr AJo Pzo Gly 120  
 120  
 OAA OTC CTO OCA OZA OCT OCT GOC CAT TAC ATT TAI GAC TTU AAT CAC  
 GLo Val Val AJo Val Tzo Cys Pzo Asp Tys 111 TYZ Asp Pzo AKA CLo 140  
 125 130  
 AAA OOC CAT OCT ZMO ACA CCO TOT CMO DMO CAT GOC MOC TMO GAO CTO  
 TYZ Gly HLo AJo Tys AJo HLo Cys Asp AJo Asp Gly Ser TCU Dzo Val 150  
 145 155  
 GTT OCA GOC GOC AAO AAO AAO AAO TPC GOC AAC TAC AAT CMO TCU AAO  
 Val Pzo AJo HLo AAO Arg TAC TPC HLo AAC TAC TAC Cys Loo Loo Lye 160  
 165 170  
 TTC ATC ACC AAT GAC AAT GAC CAC CAA COC CAC CTA TTT CAC OOC CTA GOC  
 Pzo HLo TAC AAO GLo THT AAT GYr AAO CAC AJo Val Pzo Asp Arg AJo Gly 175  
 180 185  
 ATC ATC TAC GOC CTA GAC CAC TAC ATC OCT CTS GOC Loo CTC AAO CTO  
 HLo TTT Tys THT Val GLo Tys TAC HLo Ser Ser Loo THT Val 190  
 195 200  
 GCT CTO CTC APC CTO GOC TAT TTT AAO GOC CTS CAC TCO AAO GOC AAO  
 HLo Val Loo Loo Loo AJo Tys Pzo Arg Arg Loo HLo Cys THT AJo AJo 205  
 210 215  
 TAC ATC GAC ATC CAC AAO TTC CTO TCU TTT AAO CTO POC GOC CMO AAO  
 Tys TTT HLo CAC HLo HLo Pzo Loo Ser THT AJo Ser AJo AJo Ser 220  
 225 230  
 ATC TTC CTS AAO CAC OCT CTO CTO TAC OCT OCT CTC HOC CTO OCT CTO  
 LLo Pzo Val Tys Asp HLo Val Loo Tys Ser Gly Pzo THT Ser Asp GLo 240  
 245 250  
 GOC GAO GOC CTC AAO HAO GAO GAO TAC CAC ATC ATC OCT GAO CTC CCA  
 ALo GLo Arg Loo Tys GLo GLo CLo Loo AJo CLo LLo AJo GLo Val Pzo 255  
 260 265  
 OCT CCO OCT OCT OCT OCT OCT CTA CAC TAC OCT GAC TCU GOC CTO GOC  
 Pzo Pzo Pzo AJo AJo AJo AJo Val Gly Tys AJo Gly Cys Arg AJo AJo 270  
 275 280  
 GTO AAO TTT TTC CTO TAC TTC CTC OCT AAO AAC TAC TAC TCT AAT CTC  
 Val THT Pzo Loo Tys Pzo Loo HLo AJo Val Gly Tys Ser Tys Pzo LLo Loo 285  
 290 295  
 GTC AAC GAO CTO TAC TTT CAC ACC CTO APC TTC CTO GOC OCT TTC Pzo  
 Val Gly Gly Loo Tys Loo HLo Ser Loo LLo CLo HLo AJo Pzo HLo Ser 300  
 305 310 315 320 325

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 066 | AAG | AGC | ATC | TAC | CTC | TTC | GCC | ATC | AGC | ATC | TTT | GCC | TGC | GAT | GTA | CCG | 2968 |
| 067 | Lys | Lys | Lys | Val | Leu | Tyr | Ala | Tyr | Gly | Pro | Ala | Thr | Gly | Tyr | Gly | Leu | Pro  |
|     |     |     |     | 375 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| 067 | TTG | TTC | CTG | GTG | GCT | GTC | GTG | GCT | CTC | AGA | GCA | ACC | TTG | GAC | AGC |     | 2969 |
| Ale | Val | Pro | Val | Ala | Val | Tyr | Val | Gly | Val | Arg | Ala | Thr | Leu | Ala | Thr |     |      |
|     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ACT | ATG | CTC | TGC | ATG | ACT | CTG | AGC | TGC | GCG | CAC | AGC | AGG | TGG | ATG | ATC | CAG | 3164 |
| Thr | Gly | Tyr | Cys | Tyr | Asp | Leu | Arg | Ser | Gly | His | Lys | Lys | Trp | Tle | Thr | Thr |      |
|     |     |     |     | 350 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| 030 | CAC | ATC | ATC | CTG | AGA | CTG | ATC | GTG | CTG | AAC | TTG | AGC | CTT | TTT | ATC | AAC | 3212 |
| Val | Pro | Ile | Leu | Ala | Ala | Ser | Val | Val | Leu | Asn | Phe | Ile | Leu | Phe | Ile | Asn |      |
|     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 2970 |
| ATC | ATC | GTC | CTG | CTT | GCC | ACT | AAC | GTC | CCG | CAG | AGC | ANT | GGC | GCC | GCC |     | 3260 |
| Ile | Ile | Ala | Val | Leu | Ala | Phe | Lys | Leu | Arg | Gly | Thr | Asn | Ala | Gly | Arg |     |      |
|     |     |     |     | 235 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| TGT | CAC | ACT | AGG | GAG | CAG | TGC | GCG | AAG | CTG | CTC | ACG | TGC | AGC | TTG | GTG |     | 3308 |
| Cys | Arg | Thr | Arg | Gln | Gln | Tyr | Arg | Lys | Leu | Leu | Arg | Ser | Thr | Leu | Val |     |      |
|     |     |     |     | 690 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| CTC | CTC | GGC | CTC | TTT | CTC | GTC | CAC | TAC | ACC | GTC | TTG | ATG | GGC | TTG | GGC |     | 3354 |
| Ile | Val | Phe | Leu | Phe | Gly | Val | His | Tyr | Thr | Val | Phe | His | Ala | Leu | Phe |     |      |
|     |     |     |     | 415 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| TAC | ATC | GAG | GTG | TCA | GAG | AGA | TTC | TGG | CAG | ATC | CAG | ATG | GAT | TAC | GAC |     | 3404 |
| Tyr | Thr | Glu | Val | Ser | Gly | Phe | Leu | Tyr | Gln | Ile | Gln | His | His | Tyr | Gln |     |      |
|     |     |     |     | 430 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ATG | CTC | CTG | ATC | TGC | TTC | CAC | GAA | TTT | TTT | CTT | CTC | ATG | ATG | AGA | TAC | TGT | 3452 |
| Met | Leu | Phe | Asn | Ser | Thr | Gln | Gly | Phe | Val | Ala | Phe | Thr | Gly | Tyr | Cys |     |      |
|     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| TTC | TGC | AAT | GCT | GAT | CTG | ATG | GCA | CAC | ATT | AGG | AGG | TGA | TGG | AGC | CYC |     | 3500 |
| Phe | Cys | Asn | Gly | Glu | Val | Gln | Ala | Gln | Ile | Ala | Phe | Thr | Ser | Trp | Ser | Arg |      |
|     |     |     |     | 465 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| TGG | ACA | CTG | CTC | TTG | GAT | TTC | ATG | CTG | AAA | CAA | GGT | GGT | GGG | GGT | AGG |     | 3548 |
| Trp | Thr | Leu | Ala | Leu | Asp | Phe | Lys | Arg | Lys | Ala | Arg | Ser | Gly | Ser | Ser |     |      |
|     |     |     |     | 480 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| ATC | TAC | ATC | TAT | GCT | GCA | ATG | CTG | TCT | ATC | ATC | ACT | CTG | ACC | AAT | GTG |     | 3594 |
| Ser | Tyr | Ser | Tyr | Gly | Phe | Pro | Met | Val | Ser | His | Thr | Ser | Val | Thr | Asn | Val |      |
|     |     |     |     | 495 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| GCG | GCG | GCT | GCA | GCA | CTC | AGC | CTC | GCG | GGC | GGC | CTG | CTT | CTT | CTT | CTT |     | 3644 |
| Gly | Pro | Arg | Ala | Gly | Leu | Ser | Leu | Phe | Leu | Ser | Phe | Arg | Leu | Phe | Pro | Pro |      |
|     |     |     |     | 510 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |



特表平 6-506598 (18)

[illegible]

Wages as claimed is:

拒絶されているものは以下の通りである：

[illegible]

|        |    |     |    |    |     |     |    |     |     |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |
|--------|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| PIC. 2 |    |     |    |    |     |     |    |     |     |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 691 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |       |
| CCF    | WT | CCA | AT | AT | TAC | ACT | GT | GGC | TAC | CC | ATC | CCG | CCG | CCG | TCC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC | ATC</ |

[illegible]



Fig. 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CGC | CTC | GGA | ATC | ATC | TAC | ACT | CTC | GCG | TAC | TTC | ATC | TCT | CTC | GTC | TCC | 141 |
| Arg | Leu | Gly | Met | Leu | Tyr | Thr | Leu | Gly | Tyr | Ser | Phe | Phe | Leu | Gly | Ser |     |
|     |     | 183 |     |     |     |     |     | 139 |     |     |     | 135 |     |     |     |     |
| CGC | ACT | CTC | GCT | CTG | CTC | ACT | CTT | GCT | TAC | TTC | AGC | ATC | CTA | CTT | TCC | 142 |
| Leu | Thr | Val | Ala | Val | Leu | Phe | Leu | Gly | Tyr | Phe | Arg | Arg | Leu | His | Cys |     |
|     |     | 160 |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |
| AGC | GAA | ACA | TAC | ATC | ATC | ATC | GAT | CTC | CTC | TTC | CTT | ATC | CTC | CGC |     | 143 |
| Thr | Arg | Asn | Thr | Ile | His | Met | Ala | Leu | Phe | Val | Ser | Phe | Met | Leu | Arg |     |
|     |     | 215 |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 225 |     |     |     | 230 |     |
| GCT | GTA | AGC | ATC | TTC | ATC | AGA | CAT | GCT | CTC | GAT | TAC | TTC | CGC | GTT | TTC | 144 |
| Ala | Val | Ser | Leu | Leu | Ile | Lys | Asp | Ala | Val | Leu | Tyr | Ser | Try | Val | Ser |     |
|     |     |     |     |     |     | 138 |     |     |     |     | 140 |     |     | 145 |     |     |
| ACA | GAT | GAA | ATC | CTG | CTC | ATC | CCC | CAG | GAG | CAG | TTC | AGC | CGC | CTT | ACA | 145 |
| Thr | Asp | Phe | Glu | Glu | Arg | Ile | Thr | Ala | Glu | Glu | Leu | Arg | Thr | Phe | Thr |     |
|     |     |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     | 140 |     |     |
| CGC | CTC | CTC | GCT | GCT | GAC | AGC | CGC | GCG | TTC | CTC | GAC | TGC | AAA | CTC | CGC | 146 |
| Glu | Phe | Phe | Phe | Ala | Asp | Lys | Ala | Gly | Phe | Val | Gly | Cys | Arg | Val | Ala |     |
|     |     |     |     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |
| GTA | AGC | GTC | TTC | TTC | TAC | TTC | CTC | AGC | ATC | AAC | TAC | TAC | TTC | ATC | CTC | 147 |
| Val | Thr | Val | Phe | Leu | Tyr | Phe | Leu | Thr | Asn | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Tyr | Leu |     |
|     |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |
| CTC | AAA | CGC | GTC | CTC | CGC | AGC | AGC | ATC | ATC | TTC | ATC | CTC | TTC | TTC | TCT | 148 |
| Val | Glu | Gly | Lys | Lys | Lys | His | Ser | Leu | Ile | Phe | Met | Ala | Phe | Phe | Ser |     |
|     |     |     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     | 205 | 210 |     |
| CGC | AAA | AGC | TAT | TTC | TGC | CTC | CTC | CTC | TCA | TTC | CGC | TTC | CGC | CTC | CTC | 149 |
| Leu | Lys | Lys | Tyr | Lys | Leu | Tyr | Phe | Phe | Leu | Phe | Gly | Tyr | Gly | Lys | Phe |     |
|     |     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     | 135 |     |     |
| CGC | CTC | TTC | TTC | CTC | CTC | TTC | TTC | CTC | AGC | AGC | ACT | ACA | CTC | GCC | AGC | 150 |
| Ala | Val | Phe | Val | Ala | Val | Tyr | Val | Tyr | Val | Arg | Val | Thr | Leu | Ala | Arg |     |
|     |     |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 225 |     |     | 240 |     |     |
| CGC | CGC | TGC | TGC | CGC | CGC | ACT | TTC | CGC | AAT | AGC | AAA | TGC | ATC | ATA | CAG | 151 |
| Thr | Glu | Cys | Tyr | Asp | Leu | Ser | Ser | Val | Asn | Lys | Lys | Tyr | Ile | Ile | Gln |     |
|     |     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     |     |
| CGC | AGC | AGC | CTT | CGC | CGC | ATC | GTC | GTC | ATC | TTC | TTC | CTT | ATC | CTT | ATC | 152 |
| Val | Phe | Ile | Leu | Ala | Ala | Ala | Val | Val | Ala | Ala | Ala | Leu | Phe | Ile | Asn |     |
|     |     |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     |     |
| ATA | ATC | AGA | CTC | GTC | GTC | GCT | AGC | AAA | CTC | CGC | AGC | TAT | CGC | CGC | ACA | 153 |
| Ile | Ile | Arg | Glu | Glu | Ala | Ala | Thr | Lys | Leu | Arg | Gly | Thr | Asn | Ala | Gly | Arg |
|     |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 165 |     |     |     | 160 |     |

FIG. 3.

[illegible]







特表平6-506598 (23)

FIG. 11

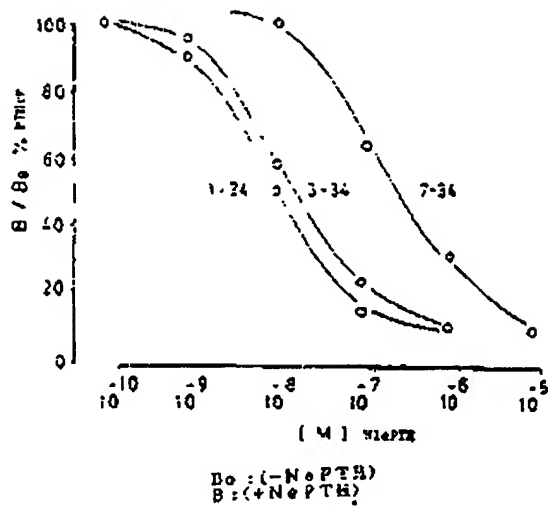


FIG. 12

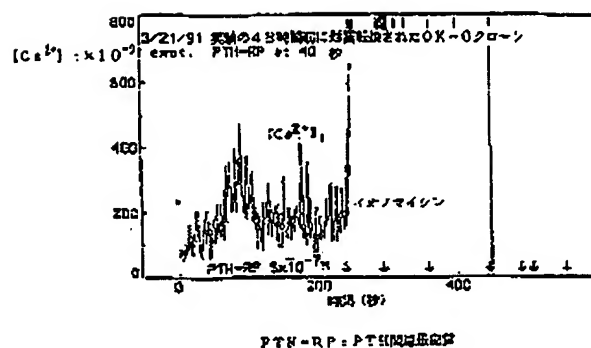


FIG. 13

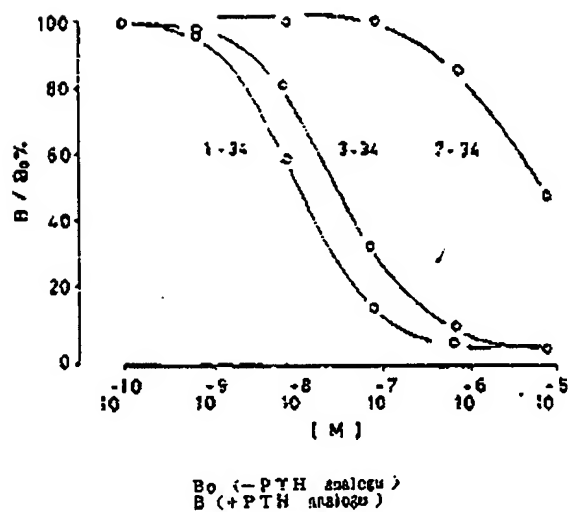
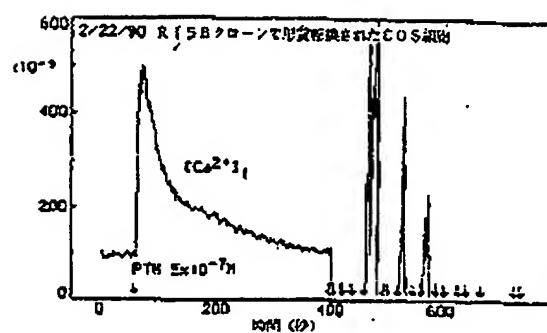


FIG. 13



特表平C-506598 (24)

FIG. 15

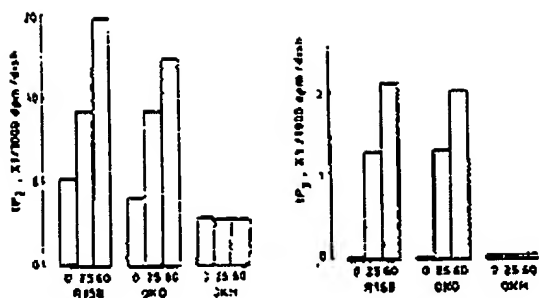


FIG. 16

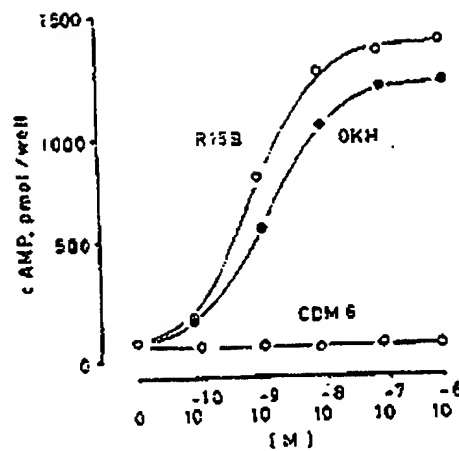


Fig. 17

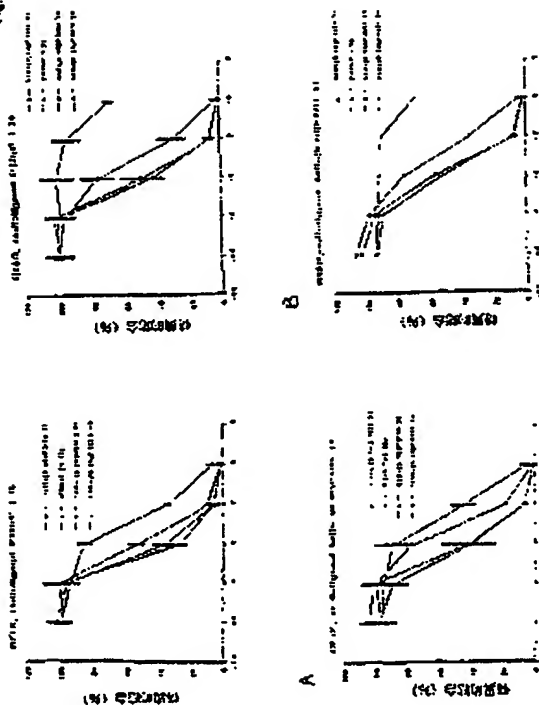
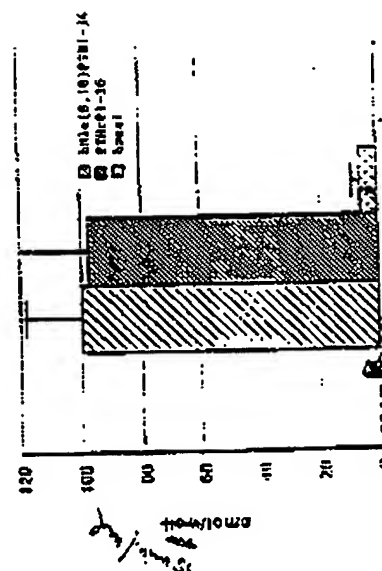
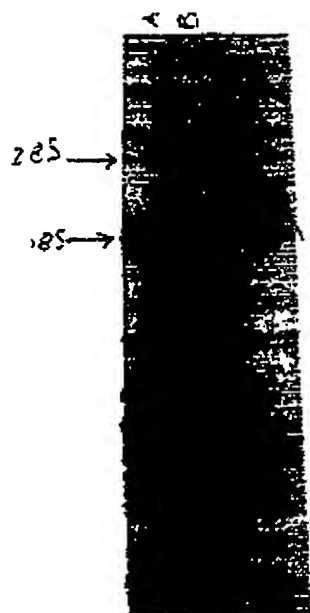


Fig. 18





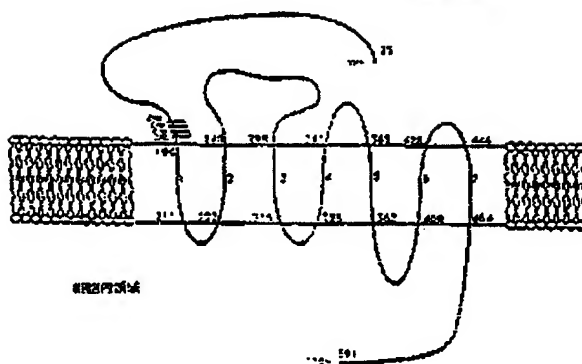
Page 19



Fig. 21

ラックの増設FTH/PTR:プレザンター

2014年10月



7つの世界最優秀研究所の「アミノ酸」研究

1 2 3  
 4 5 6  
 7 8 9  
 10 11 12

告 報 案 購 股 公

International Approval No.  
009610020512

|   |  |
|---|--|
| 1. CLASSIFICATION OF SOURCE MATTER<br>URGENT Phase One Drive Street<br>40 04 130441 1340 0 330 1 330427 30 04 210430 327 327 329<br>According to Personnel System Classification (SPC) 12 or 13 both normal data are not OK |  |
| 2. FIELDS SEARCHED<br>12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM<br>12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 3. DATE AND COMMERCIAL DATA SEARCHED JANUARY 1, 1901 TO 1997, 75, 76  |  |
| 4. Date of report (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 5. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 6. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 7. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 8. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 9. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM  |  |
| 10. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 11. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 12. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 13. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 14. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 15. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 16. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 17. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 18. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 19. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 20. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 21. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 22. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 23. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 24. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 25. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 26. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 27. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 28. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 29. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 30. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 31. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 32. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 33. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 34. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 35. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 36. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 37. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 38. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 39. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 40. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 41. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 42. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:00:00 AM   |  |
| 43. Date of data (approximate) 12/10/1998 10:00:00 AM 12/10/1998 10:0   |  |

from \$5414.75 (new company 1974)



特表平6-506598

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成12年1月18日(2000. 1. 18)

【公表番号】特表平6-506598

【公表日】平成6年7月28日(1994. 7. 28)

【年号号数】

【出願番号】特願平4-510035

【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA

A61P 3/14

5/20

A61K 38/00

39/395

C07K 7/06

7/08

14/705

16/28

C12N 5/10

C12Q 1/68

G01N 33/15

33/566

【F I】

C12N 15/00 ZNA A

A61K 31/00 603 Q

605 K

示 操 訓 生 參 (附)

全世11平: 93H

2015年12月

1. 零件名称:

1547 3670 251 002 59

## 2. 解法

著作と出版 印刷・複製

日 前 アメリカ地図 マサチューセッツ州 ホストン  
 アムーソストリート 65  
 名 姓 ジョセフ・オズボーン・ユーボレー・シモン

### 3. 5 黑 人

19 41 亞中街及改路市內橋之期：TF34812号  
電話 U423-21-2310  
22 2 (7525) 年制士 出 出 出

6. 轉入/轉出 256

1. **உதவித்தொகை**      **உதவித் தொகை**

2. 4. 1953

(1) 4000 千文を利益の送り金とする。  
(2) 資本の利益を利益の送り金とする。

1593

DNAの複製と遺伝子発現

年四月五日

ここに記述する州々の助産師は、漸アメリカ合衆国の改訂によつて現代を代表するものとあり、その数は漸的に増し、半分の増加を期する。

本誌は、「セグリ」に関する、

[illegible][illegible]

9.136.022

[illegible][illegible][illegible]



同「下流」との相反（AとC）を持つものの例（AとD）のPTM/PSTPは、  
 プレミッシュ・パ・後述に登場してはいるものの逆論への<sup>129</sup>「一般化F月（1-  
 14）（AとD）及び「1-14」のPTM/PSTP（1-3-3）（CとD）の存在を  
 示す材料である。相対するサンプルには、PTM 11-1-34）（D）、PTM  
 Y 11-1-36）（D）、PTM Y 12-3-41）（D）、PTM Y 12-3-44）（D）  
 が含まれ、データ整理の際の相対的ハートとして示され、少なくともこの二  
 つは同様の手段に二回以上は使われるものである。

江戸は江戸の時代ロマンサーと…江戸に忠告しているCOOの語句におお  
新藤氏のRMPの表現が、そのグラフである。データは4月10日と11日を  
し、そのうち10日と11日のデータは、そのグラフである。

例1) 図6に示す回路(4)と5とから、2分路(8)と9から作られた双入出力(10)のゲート(11)のノイズマージンを求めたのである。ブロッグはセットアップでFTH/PTHTドレミスターをコードして10の出力と11の出力とをバイナリットを生成した。2と8と13の出力をソールズと入出力の電圧が等しくなる。

1200bp位のゲノムDNAをSma I, Hind III, Xba I (1-9 kbエレメント) で消化し、0.8%アガロースゲルで分離した。プロットは、 $^{32}$ P-5'末端ラベルされたpTZ19プラスミドと競合して、 $^{32}$ P-5'末端ラベルされたpTZ19プラスミドと競合した。

図2-15R15Bによってコードされているプロットの例のPTH/PTMP  
1をエタノール抽出液に与える割合は5%に設定してある。

如何と云ふ

二番 [N1e<sup>+</sup> "Tyr<sup>+</sup>"] bPTH (1-34) 73F (PTH (1-34); [N1g<sup>+</sup> "Tyr<sup>+</sup>"] bPTH (3-34) 72F (PTH (3-34)) 70 [N1e<sup>+</sup> "Tyr<sup>+</sup>"] bPTH (5-34) 72F (PTH (5-34)) は Bachem Fine Chemicals, Torrance, CA 90404 社; [Tyr<sup>+</sup>] PTH (1-38) 72F (PTH (1-38)) は Kyulman et al., Ende

[illegible]

## 8.12

[illegible]

マダガスカルに分布するこの種は、(1) 3センチメートル程度で産まれ、平腹魚  
 科魚(H. A. Eippendurth, Walkerella, MD)  
 属する。めいけい、10センチメートルに達し、あるいは10センチメートルに達する  
 (Grand Island Biological Co. マダガスカル島)  
 である。これは、10センチメートルに達する。図版2の3センチメートルに達する

の法を用い、トリブレン吸着によって析出させた。

クローゼット

ミルトン・エレンバーグのPTN/PTR/Cレクターコードシステム

[illegible]

の力をもつ組織の力が成長することができ、経済社会制度は、空いて中置代  
制度で増え、アス・FCDYALU地球誌(対訳、Auechol c  
e al., Current Frotoect in Molecular  
Biology, John Wiley Sons, New York.

15日までの期間のこと)によつて判明された。これら3HNAは、太いでDEA系一成分メトラン系に取らぬため、皆々「サリトラスゴ」(NUO、タンマウ)であつたものの実効性によつて判明されたメトラン系とサリトラスゴ(CO)の両方の中であつたものと見られる。

[illegible]























http://www4.ipdl.jpo.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/NSAPITMP/we... 7/7/2004





## 特表平6-506598

16. 請求項15に記載されている本鎖DNAであって、前記 断片鎖配列が鎖末端の5'末端に位置することを含む本鎖DNA。

17. 請求項15に記載されている本鎖DNAであって、前記DNAが細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

18. 前記鎖末端の5'末端に位置する本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

19. 請求項18に記載されている本鎖DNAであって、前記DNAがアンテナとして機能することを含む本鎖DNA。

20. 前記鎖末端の5'末端に位置する本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

21. 請求項20に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

22. 請求項21に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

23. 請求項22に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

24. 請求項23に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

25. 請求項24に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

- (a) T N C T E R E Y F D R L G H I Y T V G (配列番号5)。
- (b) Y L Y S G F Y L D C A B K L T R E E L (配列番号6)。
- (c) Y Y D F L Y F L A T N Y Y G I E V E G (配列番号7)。
- (d) Y R A T L A H T G C W D L S S Q H K K W 1 1 Q Y Y (配列番号8)。
- (e) F Y T E S S Q T L W Q I Q M H Y Z H (配列番号9)。
- (f) D D V F T K E S Q T F L L H K A Q A (配列番号10)。
- (g) P F E L H K Y R H Y (配列番号11)。
- (h) E K E Y L G Q A T L (配列番号12)。
- (i) Y L A T K L H E F N A C D C D T E E E Y R K L E K (配列番号13)。

26.

(j) 前記鎖末端の5'末端に位置する本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

27. 請求項26に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

28. 請求項27に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

29. 請求項28に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

30. 請求項29に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

31. 請求項30に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

32. 請求項31に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

33. 請求項32に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

34. 請求項33に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

35. 請求項34に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

36. 請求項35に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

37. 請求項36に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

38. 請求項37に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

39. 請求項38に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

40. 請求項39に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

41. 請求項40に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

42. 請求項41に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

43. 請求項42に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

44. 請求項43に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

45. 請求項44に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

46. 請求項45に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

47. 請求項46に記載されている本鎖DNAの断片鎖配列が細胞内に存在することを含む本鎖DNA。

## 特表平 6-506598

[illegible]

36 以下の六枚から正しい断片を抽出する力点。

(2) 此に於て、自給が、四つの主要要素を成り、その第一の自給は、取上げと、

(4) 前記第一の直取等工事費、橋本型)に記せられていた細目等を別記表に附するの追加等記号工費と、

(c) 開始退職金が100万円、而して勤務から2月間を減額したの退職金60万円の差額40万円は、

(d) 前記第一の値を収束点における測定値中のカルシウムレベルと仮定し、第二の値を材料工程における測定値中のカルシウムレベルと比較して、前記第一の値と第二の値とにおける差を材料中のカルシウムレベルの局所的増減と見做し、この差をその増減と見做される材料成分。

39. 複素平面に点 \$z\$ の位置を \$\theta\$ と \$r\$ で表わすとき、\$z = re^{i\theta}\$ と表わされる。このとき、\$z\$ の共役複素数は、

40. 証人であるに現地の調査が駐米シモンズ・メンバーであつて、活動又は活動に牽連されることを行ふとする犯罪に於ては、シモンズ・メンバー。

4) 前記の如く生成されているポリヘプチドであつて、腐敗及び分解に促進されることを特徴とするポリヘプチド。

4. 請求の事由は認められず、請求を却けることとし、請求を不許可にすることを決定する。

[illegible]

●油を煮るための古甲に甲いそとを付けとす。油を煮る。

14. 請求項2名に記載されている用途用銅合金であって、

凡甲狀腺ホルモンは、以甲狀腺に於てのみ産生される。而して、甲狀腺ホルモンは、セブツリーの治癒に必要とするための物質、又は、動物の甲狀腺のホルモンに代るための物質に關して、最も適当とする治療法を模索。

6. 前項の二に於て、 $\alpha$ とされている材料は4-テノレセブターであつて、

[illegible]

4、前記第3に記述されている本ハードウェアにて、図中14のホルンを  
 しくは同の位置に位置した受口部により、他の受口部ホルンをこれとブローの  
 所になる様子をさせることができ、初期の直列ホルンより、一か所減らすための  
 位置に他の受口部を配置することを実現する。

[illegible][illegible]

(c) 患者から採取した1回分の吐瀉物中のカリンカムレベルを測定する。

陸

(16) 昭和年2月に記載されている、北の所産の石を尋ねに訪うした徳石と海老  
の生かから子取した2箇口の由は、北の所産の石と云ふことより、北の所産の石

(1) 船主は、2月9日の2つの事故現場の調査に、乗客を伴って参加した。

即ちこの間の自生試料中のカルシウムレベールがより高い場合は、図6に示す状態より、又は図7の状態より、カルシウム濃度が高い状態にあることが示される。

49. 本五における四甲鉄鉱ホムセンあるいは別甲鉄鉱ホムセンは該四角面によつて分割せられたる各ホムセンは該面を以て定する可きであつて、

(8) 町内から採取した1箇目の山椒試料中のホルシウタレペルをばせそうエ以上、

(b) 第5項28に記載されている給付受取資格の喪失に該当した場合は、その  
の発生から起算される間に公的年金の権利が失われることを決定する工程。

(c) 表14同、2同様の2つの血液成分のカルシウムレベルを比較する上  
じとなる

前記2個目の曲線群中のカル：ウとレベールの方がより狭い割合は、恐らく是  
中が卵とモン・アサゲイの卵とオナモミ・内産蛋白質に反応の差を反映であることが  
示される。



## INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

|  |           |   |
|--|-----------|---|
| <b>(51) International Patent Classification<sup>5</sup> :</b><br>C12P 21/06, C12N 5/00, 15/00<br>C07H 15/12, 17/00, C07K 3/00<br>A61K 35/14, 37/24, 37/36  | <b>A1</b> | <b>(11) International Publication Number:</b> <b>WO 92/17602</b><br><br><b>(43) International Publication Date:</b> 15 October 1992 (15.10.92)  |
| <b>(21) International Application Number:</b> PCT/US92/02821<br><b>(22) International Filing Date:</b> 6 April 1992 (06.04.92)<br><br><b>(30) Priority data:</b><br>681,702                      5 April 1991 (05.04.91)                      US<br>864,475                      6 April 1992 (06.04.92)                      US<br><br><b>(71) Applicant:</b> THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS [US/US]; Thirteenth Street, Building 149, Suite 1101, Charlestown, MA 02129 (US).<br><br><b>(72) Inventors:</b> SEGRE, Gino, V. ; 58 Sedgemoor Road, Wayland, MA 01778 (US). KRONENBERG, Henry, M. ; 48 Hastings Road, Belmont, MA 02178 (US). ABOUSAMRA, Abdul-Badi ; Four Colonial Way, Plainville, MA 02762 (US). JUPPNER, Harald ; Eight Harris Street, Boston, MA 02109 (US). POTTS, John, T., Jr. ; 129 Chestnut Street, West Newton, MA 02165 (US). SCHIPANI, Ernestina ; Four Longfellow Place, Apt. 1004, Boston, MA 02114 (US). |           | <b>(74) Agent:</b> CLARK, Paul, T.: Fish and Richardson, 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).<br><br><b>(81) Designated States:</b> AT (European patent), BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), GR (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), MC (European patent), NL (European patent), SE (European patent).<br><br><b>Published</b><br><i>With international search report.</i> |
| <b>(54) Title:</b> PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME<br><br><b>(57) Abstract</b><br><br>DNA encoding a parathyroid hormone receptor; production and isolation of recombinant and synthetic parathyroid hormone receptor polypeptides and fragments; antibodies to parathyroid hormone receptors and receptor fragments; methods for screening candidate compounds for antagonistic or agonistic effects on parathyroid hormone receptor action; and diagnostic and therapeutic methods of these compounds are disclosed.  |           |   |

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCI on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCI.

|    |                          |    |                                       |    |                          |
|----|--------------------------|----|---------------------------------------|----|--------------------------|
| AT | Austria                  | ES | Spain                                 | MG | Madagascar               |
| AU | Australia                | FI | Finland                               | ML | Mali                     |
| BB | Barbados                 | FR | France                                | MN | Mongolia                 |
| BE | Belgium                  | GA | Gabon                                 | MR | Mauritania               |
| BF | Burkina Faso             | GB | United Kingdom                        | MW | Malawi                   |
| BG | Bulgaria                 | GN | Guinea                                | NL | Netherlands              |
| BJ | Benin                    | GR | Greece                                | NO | Norway                   |
| BR | Brazil                   | HU | Hungary                               | PL | Poland                   |
| CA | Canada                   | IT | Italy                                 | RO | Romania                  |
| CF | Central African Republic | JP | Japan                                 | RU | Russian Federation       |
| CG | Congo                    | KP | Democratic People's Republic of Korea | SD | Sudan                    |
| CH | Switzerland              | KR | Republic of Korea                     | SE | Sweden                   |
| CI | Côte d'Ivoire            | LI | Liechtenstein                         | SN | Senegal                  |
| CM | Cameroon                 | LK | Sri Lanka                             | SU | Soviet Union             |
| CS | Czechoslovakia           | LU | Luxembourg                            | TD | Chad                     |
| DE | Germany                  | MC | Monaco                                | TC | Togo                     |
| DK | Denmark                  |    |                                       | US | United States of America |

- 1 -

(A) **PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA ENCODING SAME**

Background of the Invention

Partial funding of the work described herein was provided by the U.S. Government, which has certain rights to the invention. (D)

The invention relates to endocrine receptors.

A crucial step in the expression of hormonal action is the interaction of hormones with receptors on the plasma membrane surface of target cells. The formation of hormone-receptor complexes allows the transduction of extracellular signals into the cell to elicit a variety of biological responses. For example, binding of a hormone such as follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH), and chorionic gonadotropin (CG), to its cell surface receptor induces a conformational change in the receptor, resulting in the association of the receptor with a transducer molecule, the stimulatory guanine nucleotide (GTP) binding protein, a component of which is ( $G_s$ ). This association stimulates adenylate cyclase activity which in turn triggers other cellular processes such as protein phosphorylation, steroid synthesis and secretion, and the modulation of ion flux. Binding of other hormones, including arginine vasopressin (VP), angiotensin II, and norepinephrine, to their cell surface receptors results in the activation of other types of GTP binding proteins components such as ( $G_p$ ), which in turn stimulates the activity of the enzyme phospholipase C. The products of phospholipase C hydrolysis initiate a complex cascade of cellular events, including the mobilization of intracellular calcium and protein phosphorylation. (2)

Parathyroid hormone (PTH) is a major regulator of calcium homeostasis whose principal target cells occur in

- 2 -

bone and kidney. Regulation of calcium concentration is necessary for the normal function of the gastrointestinal, skeletal, neurologic, neuromuscular, and cardiovascular systems. PTH synthesis and release  
5 are controlled principally by the serum calcium level: a low level stimulates and a high level suppresses both the hormone synthesis and release. PTH, in turn, maintains the serum calcium level by directly or indirectly promoting calcium entry into the blood at three sites of  
10 calcium exchange: gut, bone and kidney. PTH contributes to net gastrointestinal absorption of calcium by favoring the renal synthesis of the active form of vitamin D. PTH promotes calcium resorption from bone by inhibiting osteoblasts and, indirectly, by stimulating  
15 differentiation of the bone-resorbing cells, osteoclasts. It also mediates at least three main effects on the kidney: stimulation of tubular calcium reabsorption, enhancement of phosphate clearance, and promotion of an increase in the enzyme that completes synthesis of the  
20 active form of vitamin D. PTH exerts these effects primarily through receptor-mediated activation of adenylate cyclase, although receptor-mediated activation of phospholipase C by PTH has also been reported (Hruska et al., J. Clin. Invest. 79:230, 1987).

25 Disruption of calcium homeostasis may produce many clinical disorders (e.g., severe bone disease, anemia, renal impairment, ulcers, myopathy, and neuropathy) and usually results from conditions which produce an alteration in the level of parathyroid hormone.

30 Hypercalcemia is a condition which is characterized by an elevation in the serum calcium level. It is often associated with primary hyperparathyroidism in which an excess of PTH production occurs as a result of a lesion (e.g., adenoma, hyperplasia or carcinoma) of the  
35 parathyroid glands. Another type of hypercalcemia,

- 3 -

humoral hypercalcemia of malignancy (HHM), is the most common paraneoplastic syndrome. It appears to result in most instances from the production by tumors (e.g., squamous, renal, ovarian or bladder carcinomas) of a novel class of protein hormone which shares amino acid homology with PTH. These PTH-related proteins (PTHrP) appear to mimic certain of the renal and skeletal actions of PTH and are believed to interact with the PTH receptor in these tissues. PTHrP is normally found at low levels in many tissues, including keratinocytes, brain, pituitary, parathyroid, adrenal cortex, medulla, fetal liver, osteoblast-like cells and lactating mammary tissues. In many HHM malignancies, PTHrP is found in the circulatory system at high levels, thereby producing the elevated calcium levels associated with HHM.

#### Summary of the Invention

The invention features isolated DNA comprising a DNA sequence encoding a cell receptor, preferably a parathyroid hormone receptor, of a vertebrate animal, which receptor has an amino acid sequence with at least 30% (preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and most preferably at least 75%) identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3 (SEQ ID NO.: 3): i.e., when the closest match is made between the two amino acid sequences (using standard methods), at least 30% of the amino acid residues of the former sequence are identical to the amino acid residues of the latter sequence. By "isolated" is meant that the DNA is free of the coding sequences of those genes that, in the naturally-occurring genome of the organism (if any) from which the DNA of the invention is derived, immediately flank the gene encoding the DNA of the invention. The isolated DNA may be single-stranded or double-stranded, and may be genomic DNA, cDNA, recombinant hybrid DNA, or

- 4 -

synthetic DNA. It may be identical to a naturally-occurring, cell receptor- (e.g. PTH receptor) encoding DNA sequence, or may differ from such sequence by the deletion, addition, or substitution of one or more

5 nucleotides. Single-stranded DNAs of the invention are generally at least 8 nucleotides long, (preferably at least 18 nucleotides long, and more preferably at least 30 nucleotides long) ranging up to full length of the gene or cDNA; they preferably are detectably labelled for

10 use as hybridization probes, and may be antisense. Preferably, the isolated DNA hybridizes under conditions of high stringency to all or part of the DNA sequence show in FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2), FIG. 3 (SEQ ID NO.:3), or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4). By

15 "high stringency" is meant, for example, conditions such as those described herein below for the isolation of human kidney PTH receptor cDNA (also see Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, hereby incorporated by reference). Most

20 preferably, the animal is a mammal (such as an opossum, a rat, or a human), and the DNA sequence encodes substantially all of the amino acid sequence shown in FIG. 1 (SEQ ID NO.:1), FIG. 2 (SEQ ID NO.:2), FIG. 3 (SEQ ID NO.:3) or FIG. 6 (SEQ ID NO.:4); or is encoded by the

25 coding sequence of one of the plasmids deposited with the American Type Culture Collection (ATCC) and designated ATCC Accession No. 68570 or 68571. The DNA of the invention may be incorporated into a vector [which may be provided as a purified preparation (e.g., a vector

30 separated from the mixture of vectors which make up a library)] containing a DNA sequence encoding a cell receptor of the invention (e.g. parathyroid hormone receptor) or fragment of the receptor, and a cell or essentially homogenous population of cells (e.g.,

35 prokaryotic cells, or eukaryotic cells such as mammalian



- 5 -

cells) which contain the vector (or the isolated DNA described above). By "essentially homogenous" is meant that at least 99% of the cells contain the vector of the invention (or the isolated DNA, as the case may be).

5 Preferably, this vector (e.g., R15B) is capable of directing expression of a parathyroid hormone receptor (for example, in a cell transfected or transformed with the vector).

10 In another aspect, the invention features a cell receptor, preferably parathyroid hormone receptor, (or an essentially purified preparation thereof) produced by expression of a recombinant DNA molecule encoding the cell receptor. An "essentially purified preparation" is one which is substantially free of the proteins and  
15 lipids with which it is naturally associated.

20 In a related aspect, the invention features a polypeptide which includes a fragment of a naturally-occurring cell receptor of the invention. Preferably, the polypeptide includes a fragment of a naturally-occurring parathyroid hormone receptor which is capable of binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein. In preferred embodiments, this fragment is at least six amino acids long, and has a sequence selected from the group including:

- 25 (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG; (SEQ ID NO.: 5)  
(b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL; (SEQ ID NO.: 6)  
(c) VTFFLYFLATNYYWILVEG; (SEQ ID NO.: 7)  
(d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP; (SEQ. ID NO.: 8)  
(e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM; (SEQ ID NO.: 9)  
30 (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA; (SEQ ID NO.: 10)  
(g) FFRLHCTRNY; (SEQ ID NO.: 11)  
(h) EKKYLWGFTL; (SEQ ID NO.: 12)  
(i) VLATKLRETNAGRCDTRQQYRKLK; or (SEQ ID NO. 13)  
(j) a fragment (i.e., a portion at least six  
35 residues long, but less than all) or analog of (a) - (i)

- 6 -

7  
which is capable of binding parathyroid hormone or  
parathyroid hormone-related protein [wherein "analog"  
denotes a peptide having a sequence at least 50% (and  
preferably at least 70%) identical to the peptide of  
5 which it is an analog]. Preferably, the polypeptide of  
the invention is produced by expression of a recombinant  
DNA molecule or is synthetic (i.e., assembled by chemical  
rather than biological means). The invention provides a  
method for producing such a polypeptide, which method  
10 includes providing a cell containing isolated DNA  
encoding a cell receptor of the invention or receptor  
fragment and culturing this cell under conditions which  
permit expression of a polypeptide from the isolated DNA.

8  
The invention also features an antibody  
15 (monoclonal or polyclonal), and a purified preparation of  
an antibody, which is capable of forming an immune  
complex with a cell receptor of the invention (preferably  
a parathyroid hormone receptor such as a human PTH  
receptor) such antibody being generated by using as  
20 antigen either (1) a polypeptide that includes a fragment  
of the cell receptor of the invention, or (2) a cell  
receptor of the invention which is on the surface of a  
cell. This antibody is preferably capable of  
neutralizing (i.e., partially or completely inhibiting) a  
25 biological activity of the cell receptor of the invention  
(i.e., a component of one of the cascades naturally  
triggered by the receptor when its ligand binds to it).  
In preferred embodiments, the antibody of the invention  
is capable of forming an immune complex with parathyroid  
30 hormone receptor and is capable of neutralizing a  
biological activity of the PTH receptor (i.e. adenylate  
cyclase activation or phospholipase C stimulation)

9  
Also within the invention is a therapeutic  
composition including, in a pharmaceutically-acceptable  
35 carrier, (a) a cell receptor of the invention, (b) a

- 7 -

9 polypeptide containing a fragment of the cell receptor of the invention, or (c) an antibody to a cell receptor of the invention. These therapeutic compositions provide a means for treating various disorders characterized by  
5 overstimulation of the cell receptors of the invention by their ligand. In preferred embodiments, the polypeptides of the invention include the PTH receptor, fragments of the PTH receptor and antibodies which form immune  
10 complexes with the PTH receptor. These polypeptides and antibodies are useful as diagnostics, for distinguishing those cases of hypercalcemia related to PTH or PTHrP from those which are not.

15 The nucleic acid probes of the invention enable one of ordinary skill in the art of genetic engineering to identify and clone cell receptor homologs or cell receptors from any species which are related to the cell receptors of the invention, expanding the usefulness of the sequences of the invention.

20 Other features and advantages of the invention will be apparent from the following description of the preferred embodiments and from the claims.

#### Detailed Description

The drawings will first be briefly described.

#### DRAWINGS

25 FIG. 1 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP receptor clone, OK-H. (SEQ ID NO.: 1)

30 FIG. 2 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the opossum kidney PTH/PTHrP receptor clone, OK-O. (SEQ ID NO.: 2)

FIG. 3 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the rat bone PTH/PTHrP receptor clone, R15B. (SEQ ID NO.: 3)

- 8 -

FIG. 4 is a comparison of the deduced amino acid sequences encoded by cDNAs from clones OK-O and R15B.

FIG. 5 is a comparison of the deduced amino acid sequences of OK-O, OK-H and R15B, lined up according to sequence homology.

FIG. 6 is a representation of the nucleic acid and amino acid sequence encoding the human PTH/PTHrP receptor. (SEQ ID NO.: 4)

FIG. 7 is a schematic representation of the rat bone PTH/PTHrP receptor cDNA, the human genomic DNA clone HPG1 and two cDNA clones encoding the human PTH/PTHrP receptor.

FIG. 8 is a hydrophobicity plot of the deduced amino acid sequence of the human kidney PTH/PTHrP receptor. Predicted membrane-spanning domains I through VII are indicated; A, B and C indicate additional hydrophobic regions.

FIG. 9 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-H.

FIG. 10 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-H.

FIG. 11 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with OK-O.

FIG. 12 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with OK-O.

FIG. 13 is a graph illustrating binding of PTHrP to COS cells transfected with R15B.

FIG. 14 is a graph illustrating stimulation of intracellular free calcium by NlePTH in COS cells transfected with R15B.

FIG. 15 is a graph illustrating stimulation of inositol phosphate metabolism by NlePTH in COS cells transfected with OK-H, OK-O, or R15B.

- 9 -

FIG. 16 is a graph illustrating cyclic AMP accumulation in COS cells transfected with CDM-8, OK-H, R15B by NlePTH.

FIG. 17 are graphs illustrating binding of  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH(1-34) (A and B) and  $^{125}\text{I}$ -labelled PTHrP(1-36) (C and D) to COS-7 cells transiently expressing the human kidney (A and C) and the rat bone (B and D) PTH/PTHrP receptor; competing ligands included PTH(1-34) ( $\square$ ), PTHrP(1-36) (\*), PTH(3-34) ( $\blacksquare$ ), PTH(7-34) (+). Data are given as % specific binding and represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments.

FIG. 18 is a bar graph illustrating stimulated accumulation of intracellular cAMP in COS-7 cells transiently expressing the human kidney receptor. Data show the mean  $\pm$  SD, and are representative of at least three independent experiments.

FIG. 19 represents a Northern blot analysis of total RNA ( $\sim 10 \mu\text{g}/\text{lane}$ ) prepared from human kidney (A) and SaOS-2 cells (B). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor; positions of 28S and 18S ribosomal RNA bands are indicated.

FIG. 20 represents a Southern blot analysis of human genomic DNA digested with SstI, HindIII, and XhoI ( $\sim 10 \mu\text{g}/\text{lane}$ ). The blot was hybridized with the full length cDNA encoding the human kidney PTH/PTHrP receptor.

FIG. 21 is a schematic diagram of the proposed arrangement, in a cellular membrane, of PTH/PTHrP rat bone receptor encoded by R15B.

30

#### MATERIALS AND METHODS

GENERAL: [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(1-34)amide (PTH(1-34)), [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(3-34)amide (PTH(3-34)), and [Nle<sup>8,18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH(7-34)amide (PTH(7-34)) were obtained from Bachem Fine Chemicals, Torrance, CA; [Tyr<sup>36</sup>]PTHrP(1-

- 10 -

36)amide (PTHrP(1-36)) was synthesized as described (Keutman et al., Endocrinology 117:1230, 1985) using an Applied Biosystems Synthesizer 420A. Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM), EDTA/trypsin, and gentamycin were 5 from GIBCO (Grand Island, NY); fetal bovine serum (FBS) was from Hyclone Laboratory, Logan, UT. Total RNA from human kidney was provided by Per Hellman, University Hospital, Uppsala, Sweden. Oligonucleotide primers were synthesized using an Applied Biosystems 380B DNA 10 Synthesizer. Restriction enzymes, Klenow enzyme, T4 polynucleotide Kinase and T4 DNA ligase were from New England Biolabs, Beverly, MA. Calf alkaline phosphatase was from Boehringer Mannheim, Germany. All other reagents were of highest purity available.

15 CELLS

Cell lines used include COS cells, OK cells, SaOS-2 cells, CHO cells, AtT20 cells, LLC-PK1 cells, and UMR-106 cells, which are available from a variety of sources including the American Type Culture Collection (Rockland, 20 Maryland), Accession Nos. CRL1650, CRL6551, HTB85, CCL61, CCL89, CL101, and CRL1161, respectively. ROS 17/2 and ROS 17/2.8 are available from a number of sources including Dr. Gideon Rodan (Merck Laboratories, West Point, PA). MC-3T3 cells are derived from mouse bone 25 cells and are also available from a number of sources including Dr. Chohei Shigeno (Dept. of Biochem. Medicine, Hyoto Univ., Kyoto, Japan).

All cells were grown in a humidified 95% air, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and maintained in monolayer culture with 30 Ham's F-12 or DMEM medium (Grand Island Biological Co.), supplemented with 5% or 10% fetal calf serum (M.A. Bioproducts, Walkersville, MD). The medium was changed every 3 or 4 days, and the cells were subcultured every 2 35 or 3 weeks by

- 11 -

trypsinization using standard methods.

CLONING

Isolation of cDNA clones encoding the rat and opossum PTH/PTHrP receptors: Total RNA was initially  
5 isolated from rat osteosarcoma (ROS) cells (ROS 17/2.8) and opossum kidney (OK) cells, by standard methods using guanidium isothiocyanate (Ullrich et al., Science 196: 1313, 1977; Chirgwin et al. Biochemistry 24: 5294, 1979), and centrifugation through cesium chloride (Gilsen et  
10 al., Biochemistry 13: 2633, 1974). Poly A+ RNAs (mRNAs) were then recovered after passage of the total RNAs over oligo dT columns (Pharmacia, Piscataway, NJ) by the method of Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad Sci. USA 69: 14087, 1972). The cDNA library from the ROS 17/2.8 mRNA  
15 was prepared from poly A+ RNA using the method of Gubler and Hoffman (Gene (Amst.) 25: 263, 1983). Oligo dT-primed and random-primed cDNAs were synthesized from poly A+ ROS 17/2.8 and OK cell mRNA, respectively (Aviv and Leder, supra). The cDNAs were ligated to BstX1 linkers  
20 (Invitrogen, San Diego, CA) and size-selected by centrifugation (3 h, 55,000 xg) in a 5-20% potassium acetate gradient. The size-selected cDNA was then inserted into the plasmid vector, pcDNA I (Invitrogen), using the non-self annealing BstX1 restriction sites.  
25 The resultant plasmid libraries were then used to transform E. coli (MC1061/P3, Invitrogen) containing a larger helper plasmid, p3. The p3 plasmid possesses amber mutations in two genes which code for ampicillin and  
30 tetracycline resistance. Using ampicillin and tetracycline selection, only those cells containing both the p3 and a tRNA suppressor gene, which is contained within pcDNA I, were capable of growth. The transformed bacteria were then grown to confluence, and the plasmid  
35 DNAs isolated using standard techniques (e.g., see

- 12 -

(13) Ausebel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley Sons, New York, 1989). These DNAs were then taken up in a DEAE-dextran solution, and used to transfect African Green Monkey kidney (COS) cells, which  
5 had been grown to 75% confluence in "sideflasks" (Nunc, Denmark).

Screening for COS cells containing plasmids capable of expressing functionally-intact ROS or OK cell parathyroid hormone/parathyroid hormone related-protein  
10 (PTH/PTHrP) receptor proteins was performed according to Gearing et al. (EMBO J. 8: 3676, 1989), with some minor modifications including DEAE-Dextran transfection in sideflasks. Forty-eight hours after transfection, the cells were tested for binding of  $^{125}\text{I}$ -labeled  $[\text{Tyr}^{36}]$ PTHrp  
15 (1-36) amide, using methods previously described (Yamamoto et al., Endocrinology 122: 1208, 1988), with the following exceptions: the time and temperature of the incubation were 2h and room temperature, respectively. After rinsing, the cells were fixed with 1.25%  
20 glutaraldehyde, and rinsed with 1% gelatin. After snapping off the top of the sideflask, the remaining microscope slide was dipped into NTB-2 photographic emulsion (Eastman Kodak, Rochester, NY). After 3-4 days of exposure at 4°C, the slides were developed, fixed, and  
25 stained with 0.03% toluidine blue. Screening of each slide was performed under a light microscope (Olympus). One pool of plasmid-DNA from ROS cells, and two pools of plasmid-DNA from OK cells, (10,000 independent clones), each gave rise to 3-4 transfected COS cells expressing  
30 the PTH/PTHrP receptor. These pools were subsequently subdivided. The subpools were used to transfect COS cells, and single clones were identified that expressed receptor protein capable of binding the radioligand.

(14) Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding  
35 the human PTH/PTHrP receptor: A human kidney oligo dT-



- 13 -

primed cDNA library ( $1.7 \times 10^6$  independent clones) in  
lambda GT10 and a genomic library of human placental DNA  
( $2.5 \times 10^6$  independent clones) in EMBL3 (Sp6/T7) (Clontech,  
Palo Alto, CA) were screened by the plaque hybridization  
5 technique (Sambrook et al., Molecular Cloning: A  
Laboratory Manual, 2nd Ed. pp. 108-113, Cold Spring  
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) with the  
 $^{32}\text{P}$ -labelled (random primed labelling kit Boehringer  
Mannheim, Germany) BamHI/NotI 1.8kb restriction enzyme  
10 fragment encoding most of the coding sequence of the rat  
bone PTH/PTHrp receptor (Fig. 3). The nitrocellulose  
filters were incubated at  $42^\circ\text{C}$  for 4 hrs in a  
prehybridization solution containing 50% formamide, 4x  
saline sodium citrate (SSC;  $1 \times \text{SSC}$ : 300 mM NaCl, 30 mM  
15 NaCitrate, pH 7.0), 2x Denhardt's solution,  
10% Dextran sulphate, 100  $\mu\text{g/ml}$  salmon sperm DNA (final  
concentration). The hybridizations were carried out in  
the same solution at  $42^\circ\text{C}$  for 18-24h. Filters were  
washed with 2x SSC/0.1% SDS for 30 minutes at room  
20 temperature and then with  $1 \times \text{SSC}$ /0.1% SDS for 30 minutes  
at  $45^\circ\text{C}$ . The films were exposed at  $-80^\circ\text{C}$  for 18-24h using  
intensifying screens.

About 1,000,000 clones were screened from each  
library. Positive clones were plaque-purified and lambda  
25 phage DNA was isolated (Sambrook et al., supra). Cloned  
inserts were removed from phage DNA by digestion with  
restriction endonucleases HindIII and EcoRI (lambda GT10  
library), or with XhoI and SstI (EMBL3 library), and were  
then subcloned into pcDNAI (Invitrogen, San Diego, CA)  
30 using the appropriate, dephosphorylated restriction  
sites. Sequencing of the  $\text{CsCl}_2$ -purified subclones was  
performed according to Sanger et al. (Biochem 74:5463,  
1977) by the dideoxy termination method (Sequenase  
version 2 sequencing kit, United States Biochemical  
35 Corporation, Cleveland, OH).

- 14 -

Reverse transcription and polymerase chain

17  
reaction (PCR): 3 µg of poly (A)+ RNA from human kidney (Clontech, Palo Alto, CA) in 73.5 µl of H<sub>2</sub>O was incubated at 100°C for 30 seconds, quenched on ice, and then added to 20 µl of 5x RT buffer (1x RT buffer: 40 mM Tris-HCl, pH 8.2, 40 mM KCl, 6.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, and dNTPs at 0.5 mM each), 2 µl (4 units) RNasin (Promega Biotec, Madison, WI), 1 µl (80 pmol/µl) of the human cDNA primer H12

10 (5'-AGATGAGGCTGTGCAGGT-3'; SEQ ID NO.: 14) and 80 units of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Life Sciences, St. Petersburg, FL). The reaction mixture was incubated for 40 minutes at 42°C. One-tenth of the first strand synthesis reaction mixture was then amplified by  
15 PCR in a final volume of 100 µl containing 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 200 µM dNTPs, 2 units of Vent polymerase (New England Biolab, Beverly, MA), and 2 µM each of the forward and the reverse primers (PCR conditions: denaturing for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 50°C, and extension at  
20 72°C for 3 minutes; 40 cycles).

Two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) degenerate primer RK-1 (5'-GGAATTCCATGGGAGCGGCCCGGAT-3'; SEQ ID NO.: 15) based on

25 G CC  
the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors (described above), and ii) primer RK-2 (5'-CGGGATCCCGCGGCCCTAGGCGGT-3'; SEQ ID NO.: 16) based on the 5' untranslated region of the human genomic clone  
30 HPG1. Both PCR reactions used the reverse primer H26 (5'-AGTATAGCGTCCTTGACGA-3'; SEQ ID NO.: 17) representing nucleotides 713 to 731 of the coding region of the human PTH/PTHrP receptor (Fig. 4). PCR products were blunt-ended using Klenow enzyme and cloned into  
35 dephosphorylated pCDNAI cut with EcoRV.

- 15 -

18  
10  
5  
Northern blot analysis: Total RNA was extracted from SaOS-2 cells and from human kidney by the guanidine thiocyanate method (Chirgwin et al., Biochem. 18:5294, 1979). For Northern blot analysis, ~10 µg of total RNA was subjected to electrophoresis on a 1.5%/37% formaldehyde gel and blotted onto nitrocellulose filters (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see above). The filters were washed at a final stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 60°C and exposed for autoradiography.

15  
20  
Southern blot analysis: Human genomic DNA was prepared using the SDS/proteinase K method (Gross-Bellard et al., Eur. J. Biochem. 36:32, 1973). For Southern analysis, ~10 µg of DNA was digested with SstI, PvuII and XhoI; subjected to electrophoresis on a 0.8% agarose gel; and blotted onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Keene, NH). The hybridization conditions were the same as those for screening the phage libraries (see above). The filters were washed at a final stringency of 0.5x SSC/0.1% SDS for 30 min at 55°C and exposed for autoradiography.

#### FUNCTIONAL ASSAYS

19  
25 Tests to characterize the functional properties of the cloned receptors expressed on COS cells included:

I) binding of PTH and PTHrP fragments and analogues, II) stimulation of cyclic AMP accumulation by PTH and PTHrP fragments and analogues,

30 III) increase of intracellular free calcium by PTH and PTHrP fragments and analogues, and

IV) activation of inositol phosphate metabolism by PTH and PTHrP fragments and analogues. The methodologies are as follows:

- 16 -

Radioreceptor Assay

20  
[Nle<sup>8</sup>, Nle<sup>18</sup>, Tyr<sup>34</sup>]bPTH-(1-34)amide (NlePTH), and  
[Tyr<sup>36</sup>]PTHrP(1-36)amide(PTHrP) were iodinated with Na<sup>125</sup>I  
(carrier free, New England Nuclear, Boston, MA) as  
5 previously reported (Segre et al., J. Biol. Chem. 254:  
6980, 1979), and purified by reverse-phase HPLC. In  
brief, the labeled peptide was dissolved in 0.1%  
trifluoroacetic acid (TFA), applied to a C<sub>18</sub> Sep-pak  
cartridge (Waters Associates, Inc., Milford, MA) and  
10 eluted with a solution of 60% acetonitrile in 0.1% TFA.  
After lyophilization, the radioligand then was applied to  
C<sub>18</sub>-μBondapak column (3.9 mm x 30 cm. Waters Associates)  
and eluted over 30 min with a linear gradient of 30-50%  
acetonitrile-0.1% TFA at a flow rate of 2 ml/min. The  
15 radioligand eluted in two peaks; the first peak, which  
eluted at approximately 38% acetonitrile, was used in  
these studies because it gave higher total and specific  
bindings. The specific activity was 500 ± 75 mCi/mg,  
which corresponds to an average iodine-peptide ratio of  
20 1.

COS-7 cells were grown in 15 cm plates in DMEM,  
10% heat-inactivated FBS, 10 mg/L gentamycin until 80-  
90% confluent. Twenty-four hours after transfection by  
the  
25 DEAE/Dextran method (Sambrook et al., *supra*), with 1-2 μg  
of plasmid DNA, the cells were trypsinized and replated  
in multiwell plastic dishes (16 or 35 mm diameter,  
Costar, Cambridge, MA) at a cell concentration of 5 x 10<sup>4</sup>  
cells/cm<sup>2</sup>). Cell number increased only slightly after  
30 transfection. After continuing culture for another 48 h,  
radioreceptor assays were performed. The culture medium  
was replaced with buffer containing 50 mM Tris-HCL (pH  
7.7),  
100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCL, 0.5% heat-inactivated  
35 fetal bovine serum (GIBCO), and 5% heat-inactivated horse

- 17 -

20 serum (KC Biological Inc., Lenexa, KS) immediately before studies were initiated. Unless otherwise indicated, studies were conducted with cells incubated in this buffer at 15°C for 4 h with  $4 \times 10^5$  cpm/ml ( $9.6 \times 10^{-11}$  M) of  $^{125}\text{I}$ -labeled NlePTH or PTHrP.

21 Incubations were terminated by aspirating the buffer, and repeatedly (x3) washing the culture dishes containing the adherent cells with chilled 0.9% NaCl solution, over a 15 sec period. Cell-bound radioactivity was recovered by the sequential addition (x3) of 1 N NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) to each well. After 30 min at room temperature, the NaOH was transferred to a glass tube. A second and third extraction with 1 N NaOH (200  $\mu\text{l}$ ) were combined with the first, and the total radioactivity was counted in a  $\gamma$ -spectrometer (Packard Instruments, Downers Grove, IL). Tracer adherence to culture vessel without cells was negligible (<0.2% of total counts added), if vessels were preincubated with culture medium.

22 Determinations of cAMP accumulation

20 Intracellular cAMP accumulation was measured as described previously (Abou-Samra et al., J. Biol. Chem. 262:1129, 1986). Cells in 24-well plates were rinsed with culture medium containing 0.1% BSA and 2mM IBMX. The cells were then incubated with PTH or PTHrP for 15 min. at 37° C. The supernatant was removed and the cells immediately frozen by placing the whole plate in dry ice powder. Intracellular cAMP was extracted by thawing the cells in 1ml of 50 mM HCl and analyzed by a specific radioimmunoassay using an anti-cAMP antibody (e.g., Sigma, St. Louis, MO). A cAMP analog (2'-O-monosuccinyl-adenosine 3':5'-cyclic monophosphate tyrosyl methyl ester, obtained from Sigma) which was used a tracer for cAMP was iodinated by the chloramine T method. Free iodine was removed by adsorbing the iodinated cAMP analog onto a C18 Sep-pak cartridge (Waters, Milford, MA).

- 18 -

After washing with  $\text{dH}_2\text{O}$ , the iodinated CAMP analog was eluted from the Sep-pak Cartridge with 40% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). The iodinated CAMP analog was lyophilized, reconstituted in 1 ml 0.1% TFA, and injected into a C18 reverse phase HPLC column (Waters). The column was equilibrated with 10% ACN in 0.1% TFA, and eluted with gradient of 10-30% ACN in 0.1% TFA. This allows separation of the mono-iodinated CAMP analog from the non-iodinated CAMP analog. The tracer is stable for up to 4 months when stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The standard used for the assay, adenosine 3':5'-cyclic monophosphate, was purchased from Sigma. Samples (1-10  $\mu\text{l}$  of HCl extracts) or standards (0.04-100 fmol/tube) were diluted in 50 mM Na-acetate (pH 5.5), and acetylated with 10  $\mu\text{l}$  of mixture of triethylamine and acetic anhydride (2:1 vol:vol). After acetylation, CAMP antiserum (100  $\mu\text{l}$ ) was added from a stock solution (1:4000) made in PBS (pH 7.4), 5 mM EDTA and 1% normal rabbit serum. The tracer was diluted in PBS (pH 7.4) with 0.1% BSA, and added (20,000 cpm/tube). The assay was incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight. The bound tracer was precipitated by adding 100  $\mu\text{l}$  of goat anti-rabbit antiserum (1:20 in PBS) and 1 ml of 7% polyethyleneglycol (MW 5000-6000), centrifuging at 2000 rpm for 30 min. at  $4^\circ\text{C}$ . The supernatant was removed and the bound radioactivity was counted in a  $\gamma$ -counter (Micromedic). Standard curves were calculated using the four-parameter RIA program supplied by Micromedic. Typically, the assay sensitivity is 0.1 fmol/ tube, and the standard concentration that displaces 50% of tracer is 5 fmol/tube.

In an alternative method for assaying CAMP accumulation, COS cells transfected with PTH/PTHrP receptor cDNA are harvested with a plastic policeman into a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.2 mM

- 19 -

23  
MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ethyleneglycolbis( $\beta$ -amino ethyl ether) *N,N'*-tetra-acetic acid (EGTA) (Sigma) and 1 mM dithiothreitol (Sigma). Cells are homogenated by 20 strokes of tightly-fitting Dounce homogenizer, and centrifuged at 13,000 x g  
5 for 15 min at 4°C (Eppendorf, type 5412, Brinkmann Instruments, Inc., Westburg, NY). The pellet containing the plasma membranes is resuspended in the same buffer by several strokes with a Dounce homogenizer, and further diluted with the same buffer to a protein concentration  
10 of approximately 1.2 mg/ml, as determined by the method of Lowry et al. (Lowry et al., J. Biol. Chem 193: 265, 1951). Approximately 30  $\mu$ g (25  $\mu$ l) membrane are incubated with varying concentrations of hormone or vehicle alone for 10 min at 37°C (final volume, 100  $\mu$ l)  
15 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.8 mM ATP, 4 x 10<sup>6</sup> cpm [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] ATP (New England Nuclear, Boston, MA), 9 mM theophylline, 4.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM KCl, 0.12% BSA, and an ATP-regenerating system containing 5 mM creatine phosphate (Schwartz/Mann Division, Becton-Dickenson &  
20 Co., Orangeburg, NY) and 0.1 mg/ml creatine phosphokinase (Shwartz/Mann). Incubations are initiated by addition of the membrane suspension and terminated by addition of 100  $\mu$ l of a solution containing 20 mM cAMP, approximately 50,000 cpm [<sup>3</sup>H]cAMP, and 80 mM ATP. The reaction mixture  
25 is boiled, and the [<sup>32</sup>P]cAMP generated is purified by sequential chromatography on ion-exchange columns (Dowex 50 W-X4, Biorad Lab, Richmond, CA) and alumina (Sigma). The [<sup>32</sup>P]cAMP may be counted in a  $\beta$ -scintillation counter (Packard Instrument Co.), with correction for recovery of  
30 [<sup>3</sup>H]cAMP.

#### Determination of intracellular free calcium

24  
Measurements of intracellular calcium levels in cells transfected with PTH/PTHrP receptor cDNAs were performed using Fura-2 AM (acetomethoxy ester of Fura-2,

- 20 -

Molecular Probes Inc., Eugene, OR) loaded cells. Details of the methodology are:

Coverslips plated with COS cells were incubated in Fura-2 AM loading buffer containing, in mM: HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), 20;  $\text{CaCl}_2$ , 1; KCl 5; NaCl, 145;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.4; glucose, 10; and Fura-2 AM 91-(2-5'-carboxyoxazol-2'-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxo-(2'-amino-5'-methylphenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid acetomethoxy ester), 0.5; at 37°C at pH7.4, aerated with 95% air and 5%  $\text{CO}_2$  for 45 minutes. Cells loaded with Fura-2 AM were then washed with a modified Krebs-Heinseleit (KH) buffer containing, in mM: HEPES, 20;  $\text{CaCl}_2$ , 1; KCl, 5; NaCl, 145;  $\text{MgSO}_4$ , 0.5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1; glucose, 5; pH7.4. To check that cleavage of the ester occurred, the excitation spectra after different times of Fura-2 AM incubation were measured. At 5 min. after the start of incubation, the excitation spectrum peaked at approximately 360 nm, reflecting incomplete hydrolysis of Fura-2 AM, whereas beyond 30 min. the excitation spectrum peaked at 345 nm, characteristic of Fura-2.

To measure fluorescence of individual cells, the cover slips were placed in a microscope tissue chamber (Biophysica Technologies, Inc., MD). The chamber consisted of a shallow, sloped compartment made of Teflon with a silicone rubber seal. The cover slips served as the bottom of the chamber. A heater/cooler ring was encased in the silicone rubber which sealed the coverslip in place. Temperatures were varied between 22°C and 37°C by applying 0-7.4 V to the heater. If the temperature is not specifically stated, the experiment was performed at 37°C. The chamber was mounted on the stage of an inverted microscope (Zeiss IM-35, Thornwood, NY). Fura-2 fluorescence was excited with a 75 watt Xenon arc lamp placed at the focal point of a condenser (Photon



- 21 -

Technologies International (PTI) Inc., NJ). Grating monochromators, alternated by a rotating chopper in which mirror vanes alternate with transmitting sectors, were used for selecting wavelengths. The monochromator outputs were combined to form a common optical path which exited the source housing through an adjustable iris. The light then passed through quartz lenses and a dichroic mirror through a 100x Nikon Fluor objective. A photon-counting PMT device detection was used to measure the light output. Data analysis was performed using PTI software run on an IBM-compatible AT/286 computer using the MS-DOS operating system. Data was retained and manipulated in a packed binary format.

Intracellular calcium concentrations were calculated according to the formula:  $[Ca^{2+}]_i = K_d(R - R_{min}) / (R_{max} - R)B$ , where R is the ratio of fluorescence of the cell at 340 and 380 nm; Rmax and Rmin represent the ratios of Fura-2 fluorescence intensity at 340 and 380 nm excitation wavelengths in the presence of a saturating amount of calcium and effectively zero calcium, respectively; B is the ratio of fluorescence of Fura-2 at 380 nm in zero calcium to that in saturating amounts of calcium; and  $K_d$  is the dissociation constant of Fura-2 for calcium. To determine Rmax, at the end of an experiment ionomycin was added to the Fura-2 AM loaded cells to equilibrate  $Ca^{2+}$  between the extracellular (1mM) and intracellular environments. To calculate Rmin, 1mM EGTA was then added to the bathing solution. Different dissociation constants were used at the different temperatures: 224 nM at 34-37°C and 135 nM at 24-27°C.

#### Determination of inositol phosphate

The level of inositol phosphate metabolism was determined in COS cells transfected with PTH/PTHrP

- 22 -

23  
cont. receptors using previously published methods (Bonventre, et al., J. Biol. Chem. 265: 4934, 1990).

## RESULTS

### Molecular characterization

5 Two independent clones (OK-H and OK-O), both of which were isolated from the OK cell cDNA library, had lengths of approximately 2 kilobases. The determined  
18 nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of these clones are shown in Figs. 1 (SEQ ID NO.:1) and 2  
10 (SEQ ID NO.:2) respectively. The R15B clone isolated from the ROS cell cDNA library had a length of approximately 4 kilobases. The determined nucleotide  
sequence and predicted amino acid sequence of the rat bone PTH/PTHrP receptor is depicted in Fig. 3 (SEQ ID  
15 NO.:3).

29 The three cDNA clones appear to be full-length by the criteria of having codons encoding methionine residues that are predicted to be the likely candidates as initiator methionines. These methionine codons are  
20 followed by amino acid sequences (deduced from the DNA) with properties suggesting that they are "signal-peptide" sequences. All three receptor cDNAs have stop codons at locations that permit these receptors to "fit" a putative seven-membrane spanning model, a model typical for G-  
25 protein-linked receptors. Most importantly, all three cloned receptors bind ligands and, when activated, are capable of activating intracellular effectors. These properties suggest that all three of the isolated clones encode full-length cDNAs.

30 Fig. 4 demonstrates the high degree of homology between the amino acid sequences encoded by the cDNAs from OK-O and ROS 15B. There is an overall 87% homology and a 77.8% amino acid identity between these two  
30 receptors. This high level of identity over long

- 23 -

30 stretches of amino acids demonstrates that the amino acid  
sequence of the PTH receptor is evolutionarily conserved  
to a high degree. This allows the data from both OK-O  
and R15B to be extrapolated to other species, including  
5 human.

Fig. 5 shows the deduced amino acid sequences of  
all three cloned cDNAs lined up according to sequence  
homology. The OK-H sequence is identical to OK-O except  
in the C-terminus tail, where the OK-O sequence totals  
10 585 amino acids whereas the OK-H sequence stops at 515  
amino acids. This difference is attributable to a single  
nucleotide (G) deleted in the OK-H sequence compared to  
the OK-O sequence, causing a frame shift and early stop  
codon in the former. It is not known whether OK-O and  
15 OK-H represent the products of two separate genes or of a  
laboratory artifact.

Some G-protein-coupled receptors are encoded by  
intronless genes (Kobilka et al., Nature 329:75, 1987);  
Kobilka et al., J. Biol. Chem. 262:7321, 1987; Heckert et  
20 al., Mol. Endocrinol. 6:70, 1992; Kobilka et al., Science  
238:650, 1987; Bonner et al., Science 237:527, 1987;  
Sunahara et al., Nature 347:80, 1990). To isolate a  
human PTH/PTHrP receptor cDNA, both a human cDNA library  
and a human genomic library were screened with a probe  
30 (BamHI/NotI) representing most of the coding region of  
the rat bone PTH/PTHrP receptor (Fig. 3). Screening the  
human kidney cDNA library led to the isolation of the  
clone HK-1 (Fig. 6) [SEQ ID NO.: 6]. Since one of the  
two EcoRI cloning sites of lambda GT10 proved to be  
30 eliminated as a result of the library construction, the  
HindIII/EcoRI phage fragment containing the cDNA insert  
and ~250 bp of the 37 kb (left) lambda arm was subcloned  
into the corresponding restriction sites in pCDNAI. DNA  
sequencing revealed that the cloned cDNA contained ~1000  
35 bp of the 3' coding region and ~200 bp of the 3' non-

- 24 -

32  
5 coding region including an A-rich 3' end. The coding region 5' to the XhoI site was subsequently used to re-screen the library and led to the isolation of the clone HK-2 which, after subcloning into pCDNAI, proved to contain ~1400 bp of the coding region. For the third screening of the library, the PvuII/PstI fragment of HK-2 was used; the isolated clone HK-3 proved to be identical to HK-2.

33  
10 The genomic library screening (~10<sup>6</sup> pfu) resulted in the isolation of four independent clones. Comparison of Southern blot analyses of restriction enzyme digests of these clones with that of normal genomic DNA, revealed that one 15 kb genomic clone, HPG1 (also referred to as HG4A), contained a SstI/SstI fragment that had the same  
15 size as one hybridizing DNA species from normal human genomic DNA digested with SstI (see below). The hybridizing 2.3 kb SstI/SstI DNA fragment and an ~8 kb XhoI fragment which comprised the SstI/SstI fragment were both subcloned into pCDNAI. Further Southern blot  
20 analysis of the SstI/SstI DNA fragment revealed that an ~1000 bp BamHI/SstI fragment encoded a portion of the human PTH/PTHrP receptor which later proved to represent the exon encoding the putative signal peptide and the 5' non-translated region which is interrupted by an ~1000 bp  
25 intron (Fig. 7).

34  
30 To isolate the remaining ~450 nucleotides of the coding region, poly (A)+ RNA from human kidney was reverse transcribed after priming with H12 (Fig. 7). After single strand synthesis, two independent PCRs were performed using two different forward primers: i) a degenerate primer RK-1 based on the 5' coding end of the two previously cloned PTH/PTHrP receptors, OK-0 and R15B; and ii) primer RK-2 based on the 5' non-coding region of HPG1. H-26 was used as the reverse primer for both  
35 reactions. Southern blot and restriction map analyses

- 25 -

confirmed the expected size of the amplified DNA encoding the human PTH/PTHrP receptor. The blunt-ended PCR products encoding the 5' end of the human PTH/PTHrP were cloned into pCDNAI using the dephosphorylated EcoRV sites. Sequence analysis of each PCR clone confirmed their 5' nucleotide difference due to the difference in forward primer sequence, but revealed otherwise identical sequences. Nucleotide sequencing of both strands of the human PTH/PTHrP receptor cDNA revealed an open reading frame encoding a 593-amino acid protein (Fig. 6, SEQ ID NO.:4).

The full-length human kidney PTH/PTHrP receptor cDNA, HKrk, was constructed using the BamHI/PvuII fragment of PCR clone #2 and HK-2. Using the full-length cDNA encoding the human PTH/PTHrP receptor, Northern blot analysis of total RNA (~10 µg/lane) from human kidney and SaOS-2 cells revealed one major hybridizing DNA species of ~2.5 kb (Fig. 19). The XhoI digest of normal human genomic DNA, when probed with the same full-length cDNA (Fig. 20), revealed one major hybridizing species of about 5.5 kb, and two DNA species of 4 and 8 kb which weakly hybridized. These data suggest that the human PTH/PTHrP receptor is the product of a single gene. This full-length clone was then transiently expressed in COS-7 cells for functional and biological characterization by the methods cited above.

Comparison of the human receptor with the opossum kidney PTH/PTHrP receptor and the rat bone PTH/PTHrP receptor, revealed 81% and 91% amino acid sequence identity, respectively, and consequently a very similar hydrophobicity plot (Fig. 8). All extracellular cysteines including the two cysteine residues in the presumed signal peptide are conserved, as are all potential, extracellular

- 26 -

26 N-glycosylation sites. A number of the amino acids which were not identical between the human kidney and rat bone PTH/PTHr receptors were found to be conserved between the human and the opossum receptors. These conserved amino acids include an Arg to Leu at 51, an Arg to Trp at 58, an Arg to His at 262, an Asp to His at 358, an Ile to Thr at 422, and a Thr to Leu at 427.

#### Biological Characterization

37 Functional characterization of the biological properties of the opossum and rat PTH/PTHrP receptors was performed in transiently transfected COS cells by a radioreceptor assay technique using both  $^{125}\text{I}$ -PTHrP and  $^{125}\text{I}$ -NlePTH as radioligands, and by bioassays that measure ligand-stimulated cAMP accumulation, increase in intracellular free calcium, and stimulation of inositol phosphate metabolism, by the methods cited above.

38 Fig. 9 demonstrates that COS cells expressing OK-H bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by OK-H.

39 Fig. 10 demonstrates that COS cells expressing OK-H increase their concentration of intracellular free calcium when exposed to NlePTH, but to a smaller extent (mean = 39 nm), or not at all, when compared to COS cells expressing OK-O or R15B receptors (Fig. 12 and Fig. 14) and stimulated with NlePTH. Unlike COS cells expressing

- 27 -

OK-O or R15B, COS cells expressing OK-H do not show a detectable increase in metabolism of inositol phosphate when stimulated with NlePTH (Fig. 15).

Fig. 11 demonstrates that COS cells expressing OK-O bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by OK-O.

Fig. 12 demonstrates that COS cells expressing OK-O increase their concentration of intracellular free calcium and their rate of inositol phosphate metabolism after stimulation with NlePTH and PTHrP (Fig. 15).

Fig. 13 demonstrates that COS cells expressing R15B bind  $^{125}\text{I}$ -PTHrP. These data also demonstrate that binding of PTHrP is inhibited when intact PTH (1-34) or PTH analogues which are shortened at their amino terminus (i.e. the 3-34 and 7-34 analogues, which contain Nle substitutions for methionine at positions 8 and 18 and a tyrosine substitution for phenylalanine at position 34) are used as competitors for binding. Similarly, binding of  $^{125}\text{I}$ -NlePTH to COS cells expressing OK-H was inhibited when PTHrP or PTHrP fragments were used as competitors. These data indicate that PTH and PTHrP both bind to the receptor encoded by R15B.

Fig. 14 demonstrates that COS cells expressing R15B increase their concentration of intracellular calcium to an extent similar to stimulated COS cells expressing OK-O.

- 28 -

Fig. 15 demonstrates that COS cells expressing R15B or OK-O increase their rate of phosphatidyl inositol hydrolysis, as evidenced by the rapid increase in inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and inositol bisphosphate (IP<sub>2</sub>) accumulation after stimulation of the cells with NlePTH or PTHrP. Conversely, COS cells expressing OK-H did not show any detectable increase in inositol trisphosphate and inositol bisphosphate accumulation after stimulation with NlePTH or PTHrP. These data suggest that the PTH receptor encoded by R15B and OK-O is coupled to phospholipase C, presumably through G<sub>p</sub>. Since the only difference between OK-O and OK-H is in the cytoplasmic C-terminal tail, these data strongly suggest that the C-terminus of the PTH receptor encoded by OK-O and R15B is involved in the activation of phospholipase C.

Fig. 16 demonstrates that COS cells expressing R15B and OK-H increase cAMP accumulation after stimulation with NlePTH. Similar results were obtained in COS cells expressing OK-O. No cAMP stimulation was detected in COS cells transfected with the cDM8 vector alone. These data suggest that PTH receptor coupling to adenylate cyclase does not require the full length C-terminal cytoplasmic tail of the receptor.

These data demonstrate that all three PTH/PTHrP receptors cloned from both OK and ROS cell cDNA libraries bind the amino-terminal ligands of both peptides equivalently. Activation of all these receptors by ligand stimulates adenylate cyclase (as measured by increased intracellular cAMP), presumably through activation of one class of guanine nucleotide binding proteins (G-proteins). G-proteins have a trimeric peptide structure in which one of the subunits, alpha, is distinct, and the other two, beta and gamma, are identical or highly homologous. One of these G-proteins



- 29 -

(G<sub>s</sub>) contains G-alpha-"stimulatory" (G-alpha-s) which is involved in the activation of adenylate cyclase.

Binding of ligand to OK-O and R15B, but not to OK-H, also increases intracellular free calcium and stimulates metabolism of inositol phosphate. These properties strongly suggest that activation of both OK-O and R15B receptors by ligand results in stimulation of a second intracellular effector, phospholipase C. The coupling mechanism between these activated receptors and phospholipase C is likely to be a G-protein which is distinct from G<sub>s</sub>. In contrast, the properties of the activated OK-H receptor which is truncated at the carboxy terminus, suggest that it may not activate phospholipase C, or that it activates phospholipase C inefficiently.

The biochemical role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor was further investigated by the construction of a carboxy-terminally-truncated rat receptor, R480, by standard PCR technology using R15B as a template and an upstream primer containing a stop codon inserted at position 481. Briefly, the upstream primer was a synthetic oligonucleotide based on nucleotides 1494-1513 of the rat cDNA sequence (see Fig. 3; SEQ ID NO.: 3) to which a stop codon and an XbaI cloning site were added. Thirty PCR cycles were carried out, each cycle consisting of 1 min at 92°C for denaturation, 1 min at 60°C for annealing, and 1 min at 72°C for extension. The product was cut with NsiI and XbaI and purified by gel electrophoresis. R15B was sequentially digested with XbaI and NsiI, and the purified PCR product was then ligated into the XbaI-NsiI cut R15B vector. The resulting plasmid, R480, was amplified in bacteria and sequenced.

R480 encodes 480 amino acids that are identical to those in the 591 amino acids receptor. This truncated cDNA was expressed in COS-7 cells (transient expression)

- 30 -

and in CHO cells (stable expression). Both COS-7 and CHO cells expressing the truncated receptor, R480, and the wild type receptor, RB, bind PTH(1-34) with equivalent affinities. When activated, R480 stimulates CAMP accumulation in COS7 and CHO cells as efficiently as does the wild type receptor. In contrast to the wild type receptor, R480 did not mediate any increase in  $[Ca^{2+}]_i$  when stimulated by PTH in either the COS-7 cells or the CHO cells. These data indicate that the molecular requirements for activation of phospholipase C and adenylate cyclase by PTH/PTHrP receptor are distinct from each other, and point to a major role of the carboxy-terminal tail of the PTH/PTHrP receptor in coupling to phospholipase C but not to adenylate cyclase. Of course, it is also possible that activated PTH/PTHrP receptors may activate additional G-proteins and/or intracellular effector molecules.

Analysis of COS-7 cells transfected with the cloned human PTH/PTHrP receptor demonstrated that radiolabelled PTH(1-34) and PTHrP(1-36) (~200,000 cpm) bound to the expressed receptors with similar efficiency (specific binding:  $10.1 \pm 3.7\%$  and  $7.6 \pm 6.0\%$ , respectively) to that observed for COS-7 cells expressing R15B (specific binding:  $8.1 \pm 3.5\%$  and  $7.1 \pm 4.1\%$ , respectively). The expressed human PTH/PTHrP receptors bound PTH(1-34) with 2-fold higher apparent  $K_d$  than did the rat bone PTH/PTHrP receptor: ~5 nM versus ~10 nM (Fig. 17). However, despite their high degree of amino acid homology, the two receptors showed significant differences in affinity for PTH(3-34) and PTH(7-34). PTHrP(1-36) displayed a 2- to 4-fold lower affinity for the human PTH/PTHrP receptor than for the rat receptor (~35 nM for HKrk versus ~10 nM for R15B) which appeared more pronounced when PTHrP(1-36) was used as radioligand. The affinities for PTH(3-34) and PTH(7-34) were 7- and

- 31 -

35-fold higher with the expressed HKrK than with R15B (~7 nM versus ~45 nM for PTH(3-34), respectively; ~60 nM versus ~2000 nM for PTH(7-34), respectively). In COS-7 cells expressing either receptor, both PTH(1-34) and PTHrP(1-36) stimulated the increase in intracellular free calcium and cAMP accumulation to the same extent (Fig. 18).

#### Relationship of PTH/PTHrP receptors

39 The amino acid sequence of the human PTH/PTHrP receptor displays a very high degree of conservation compared to the bone PTH/PTHrP receptor from rat, a eutherian mammal, while its sequence identity with the PTH/PTHrP receptor with the opossum, a marsupial mammal, is less marked. Like the opossum kidney and the rat bone receptor, the human kidney receptor induces an increase in both intra-cellular cAMP and intracellular free calcium when challenged with either PTH or PTHrP. Despite the high degree of homology between the human PTH/PTHrP receptor and the opossum and rat homologs, the transiently expressed human receptor has some functional characteristics that are distinct from those of the rat bone receptor. These include a slightly higher affinity for PTH(1-34) and a significantly decreased affinity for PTHrP(1-36). Higher affinities were observed for PTH(3-34) and in particular for PTH(7-34), the affinity of which for the human receptor was about 35-fold higher in comparison to the rat bone receptor. These findings may have significant implications for the future development of PTH/PTHrP analogues, since they predict that species-specific tissues would be the appropriate tissues for testing the potency of antagonists (and agonists) *in vitro*.

#### Relationship of PTH/PTHrP receptors to other receptors

40 The biochemical properties of PTH and PTHrP receptors suggest that they are members of the class of

- 32 -

membrane receptor molecules known as G-protein-linked membrane receptors. The structural features of well-characterized G-protein receptors indicate that they all have at least seven regions of several consecutive  
5 hydrophobic amino acids, each of which regions is of sufficient length to span the plasma membrane.

One subfamily of G-protein-linked membrane receptors, termed the glycopeptide receptor subfamily, includes receptors that bind and are activated by  
10 glycopeptide hormones (thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and chorionic gonadotropin). All of these receptors are characterized by (1) extensive putative amino-terminal extracellular domains (greater than 300 amino acids) that  
15 are thought to contain some or all of the ligand-binding domains, and (2) considerable amino-acid homology, particularly in the seven putative transmembrane domains. A second subfamily, termed the adrenergic/muscarinic  
20 subfamily, includes receptors that are activated by small ligands, such as the catecholamines, neuromuscular transmitters, and retinol. These receptors are all characterized by relatively short (25-75 amino acids) putative amino-terminal extracellular domains, as well as considerable amino acid homology, particularly in the  
25 seven putative transmembrane domains. Activation of these receptors by their ligands appears to involve at least several of the multiple transmembrane domains, and does not appear to involve the amino-terminal portion of the receptors.

30 Several structural characteristics which can be deduced from the predicted amino acid sequence of the rat PTH/PTHrP receptor (Fig. 3) indicate that the PTH/PTHrP is a G-protein-linked receptor. The amino terminus shows characteristic features of a signal peptide, including a  
35 hydrophobic domain and the presence of three consecutive

- 33 -

leucine residues. This amino acid stretch of 20-28 amino acids may serve as a leader sequence, similar to the amino terminus preceding the extracellular domains of other glycoprotein receptors. There is also a cluster of 5 seven hydrophobic segments which represent putative membrane-spanning domains (Fig. 19).

The predicted amino acid sequences of the opossum kidney, rat bone and human kidney PTH/PTHrP receptors indicate that they do not fit comfortably into either of these G-protein linked receptor subfamilies. Overall homology of the rat and human PTH/PTHrP receptors with the glycopeptide receptor and adrenergic/muscarinic subfamilies is approximately 10 to 20%, with a somewhat higher degree of homology within the transmembrane domains. The latter is to be expected because of the limited menu of hydrophobic amino acids that could occur in those regions. Twenty percent homology is far less than that found among the receptors generally accepted to be members of each of these subfamilies. Additionally, there are no portions of these sequences that have what could be characterized as intense homology (i.e., exactly matching amino acid sequences), even over limited regions.

Recent comparison with the newly characterized secretin and calcitonin receptors (Ishihara et al., EMBO J 10:1635, 1991; Lin et al., Science 254:1022, 1991) has revealed between 30 and 40% identity between these receptors and the PTH/PTHrP receptor. Although the PTH/PTHrP receptor is more than 100 amino acids longer than the calcitonin receptor, there is an ~32% identity between the amino acid sequences of the opossum kidney PTH/PTHrP receptor (SEQ ID NO NO.:2) and porcine kidney calcitonin receptor (GenBank accession no. M74420). A stretch of 17 out of 18 amino acids in the putative transmembrane domain VII are identical. Also, two out of

- 34 -

four N-linked glycosylation sites and the position of seven out of eight potentially extracellular cysteines are conserved. Major differences between the two receptors appear to lie in their NH<sub>2</sub>-terminal and COOH-terminal domains. Comparison of amino acid sequences of the rat secretin receptor (GenBank accession no. X59132) and the human PTH/PTHrP receptor indicates that there is a 43% identity between these two receptors, with a stretch of 21 out of 25 amino acids of the putative transmembrane domain VII being identical. The similarity between the PTH/PTHrP, calcitonin and secretin receptors suggests that they represent a new family of seven transmembrane-spanning G protein-coupled receptors that activate adenylate cyclase. Given the amino acid sequences of these receptors, those skilled in the art would be able to compare these sequences for regions of identity which would be useful in the design of nucleic acid probes which could then be used for the identification and isolation of other receptors which would belong to this family.

#### Deposit of Clones

Under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure, the cDNA expression plasmids R15B, OK-O, and OK-H; the phage HPG1; and a plasmid (termed 8A6) containing part of the human clone have been deposited with the American Type Culture Collection (ATCC), where they bear the respective accession numbers ATCC No. 68571, 68572, 68573, 40998 and 68570. Applicants' assignee, The General Hospital Corporation, represents that the ATCC is a depository affording permanence of the deposits and ready accessibility thereto by the public if a patent is granted. All restrictions on the availability to the

- 35 -

public of the material so deposited will be irrevocably removed upon the granting of a patent. The material will be available during the pendency of the patent application to one determined by the Commissioner to be  
5 entitled thereto under 37 CFR 1.14 and 35 U.S.C. 122. The deposited material will be maintained with all the care necessary to keep it viable and uncontaminated for a period of at least five years after the most recent  
10 request for the furnishing of a sample of the deposited plasmid, and in any case, for a period of at least thirty (30) years after the date of deposit or for the enforceable life of the patent, whichever period is longer. Applicants' assignee acknowledges its  
15 responsibility to replace the deposits should the depository be unable to furnish a sample when requested due to the condition of the deposit.

#### POLYPEPTIDES

Polypeptides according to the invention include the opossum and rat and human parathyroid hormone  
20 receptors as shown in Figs. 1-3 and 6, respectively, and any other naturally-occurring receptor which can be produced by methods analogous to those used to clone and express these receptors, or by methods utilizing as a  
25 probe all or part of one of the sequences described herein. In addition, any analog or fragment of a PTH receptor capable of binding to a parathyroid hormone or a parathyroid hormone-related protein is within the invention.

Specific receptor analogs of interest include  
30 full-length or partial receptor proteins having an amino acid sequence which differs only by conservative amino acid substitutions: for example, substitution of one  
35 amino acid for another of the same class (e.g., valine for glycine; arginine for lysine, etc.), or by one or more non-conservative amino-acid substitutions,

- 36 -

deletions, or insertions located at positions which do not destroy the receptor's ability to bind to parathyroid hormone or parathyroid hormone-related protein.

Specific receptor fragments of particular interest include, but are not limited to, portions of the receptor deduced to be extracellular from the primary amino acid sequence, using a hydrophobicity/hydrophilicity calculation such as the Chou-Fasman method (see, e.g., Chou and Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47:251, 1978). Hydrophilic domains, particularly ones surrounded by hydrophobic stretches (e.g., transmembrane domains) of at least 10 amino acids, present themselves as strong candidates for extracellular domains. Fig. 21 illustrates a predicted arrangement of extracellular, intracellular, and transmembrane domains of one PTH receptor.

Examples of specific PTH receptor fragments include those with the following amino acid sequences (shown as standard single-letter symbols), derived from the deduced amino acid sequence of the R15B clone:

Extracellular domains:

RP-1: TNETREREVFDRLGMIYTVG (SEQ ID NO.: 5)

RP-2: VLYSGFTLDEAERLTEEEL (SEQ ID NO.: 6)

RP-3: VTFFLYFLATNYYWILVEG (SEQ ID NO.: 7)

RP-4: Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP (SEQ ID NO.: 8)

RP-5: PYTEVSGTLWQIQMHYEM (SEQ ID NO.: 9)

RP-6: DDVFTKEEQIFLLHRAQA (SEQ ID NO.: 10)

Intracellular domains:

RPI-7: FRRLHCTRNY (SEQ ID NO.: 11)

RPI-8: EKKYLWGFTL (SEQ ID NO.: 12)

RPI-9: VLATKLRETNAGRCDTROQYRKLLK (SEQ ID NO.: 13)

These fragments were synthesized and purified by HPLC according to the method of Keutmann et al.,

(Endocrinology 117: 1230, 1984).



- 37 -

EXPRESSION OF POLYPEPTIDES

5 Polypeptides according to the invention may be produced by expression from a recombinant nucleic acid having a sequence encoding part or all of a cell receptor of the invention, using any appropriate expression system: e.g., transformation of a suitable host cell (either prokaryotic or eukaryotic) with the recombinant nucleic acid in a suitable expression vehicle (e.g., pCDNAI). The precise host cell used is not critical to 10 the invention; however, in the case wherein the polypeptides of the invention include all or part of the PTH/PTHrP receptor, the following host cells are preferred: COS cells, LLC-PK1 cells, OK cells, AtT20 cells, and CHO cells. The method of transfection and the 15 choice of expression vehicle will depend on the host system selected. Mammalian cell transfection methods are described, e.g., in Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989); expression vehicles may be chosen from those discussed, 20 e.g., in Cloning Vectors: A Laboratory Manual (P.H. Pouwels et al., 1985, Supp. 1987). Stably transfected cells are produced via integration of receptor DNA into the host cell chromosomes. Suitable DNAs are inserted into pCDNA, pCDNAI-Neo, or another suitable plasmid, and 25 then cells are transfected with this plasmid with or without cotransfection with psV-2-Neo, or psV-2-DHFR by standard electroporation, calcium phosphate, and/or DEAE/Dextran techniques. Selection of transfected cells is performed using progressively increasing levels of 30 G418 (Geneticin, GIBCO), and if necessary, methotrexate.

52 DNA sequences encoding the polypeptides of the invention can also be expressed in a prokaryotic host cell. DNA encoding a cell receptor or receptor fragment is carried on a vector operably linked to control signals 35 capable of effecting expression in the prokaryotic host.

- 38 -

If desired, the coding sequence may contain, at its 5' end, a sequence encoding any of the known signal sequences capable of effecting secretion of the expressed protein into the periplasmic space of the host cell, thereby facilitating recovery of the protein and subsequent purification. Prokaryotes most frequently used are various strains of E. coli; however, other microbial strains may also be used. Plasmid vectors are used which contain replication origins, selectable markers, and control sequences derived from a species compatible with the microbial host. For example, E. coli may be transformed using derivatives of pBR322, a plasmid constructed by Bolivar et al. (Gene 2: 95, 1977) using fragments derived from three naturally-occurring plasmids, two isolated from species of Salmonella, and one isolated from E. coli. pBR322 contains genes from ampicillin and tetracycline resistance, and thus provides multiple selectable markers which can be either retained or destroyed in constructing the desired expression vector. Commonly used prokaryotic control sequences (also referred to as "regulatory elements") are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences. Promoters commonly used to direct protein expression include the beta-lactamase (penicillinase), the lactose (lac) (Chang et al., Nature 198: 1056, 1977) and the tryptophan (Trp) promoter systems (Goeddel et al., Nucl. Acids Res. 8: 4057, 1980) as well as the lambda-derived P<sub>L</sub> promoter and N-gene ribosome binding site (Simatake et al., Nature 292:128, 1981).

The nature of the cell receptor proteins of the invention is such that, upon expression within a cell, it is moved to the cellular membrane and partially through the membrane, so that part of it remains embedded in the

- 39 -

membrane, part extends outside the cell, and part remains within the cell. Transformed cells bearing such embedded cell receptors may themselves be employed in the methods of the invention, or the receptor protein may be  
5 extracted from the membranes and purified.

Expression of peptide fragments lacking the hydrophobic portions of the protein responsible for anchoring the intact protein in the cellular membrane would not be expected to become embedded in the membrane;  
10 whether they remain within the cell or are secreted into the extracellular medium depends upon whether or not a mechanism promoting secretion (e.g., a signal peptide) is included. If secreted, the polypeptide of the invention can be harvested from the medium; if not, the cells must  
15 be broken open and the desired polypeptide isolated from the entire contents of the cells. Specific examples of polypeptides which might be expressed include, without limitation:

1) Amino-terminal portion comprising amino acids  
20 1-192, including the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.

2) Amino-terminal portion comprising amino acids 27-192, excluding the putative leader sequence, of the rat bone PTH/PTHrP receptor as shown in Fig. 3.

25 3) The full-length PTH/PTHrP receptor from rat bone, as shown in Fig 3.

4) RP-1 (as described above).

5) RP-2 (as described above).

The polypeptide of the invention can be readily  
30 purified using affinity chromatography. Antibodies to these polypeptides, or the receptor specific ligands, (e.g., the hormones PTH and PTHrP for the PTH/PTHrP receptor) may be covalently coupled to a solid phase support such as Sepharose 4 CNBr-activated sepharose  
35 (Pharmacia), and used to separate the polypeptide of the

- 40 -

invention from any contaminating substances. Typically 1 mg of ligand or antibody will be incubated with CNBr-activated sepharose at 4°C for 17-20 h (with shaking). The sepharose is rinsed with 1 M Tris HCL (pH8) to block excess active sites. The sepharose-PTH, sepharose-PTHrP, or sepharose-antibody is then incubated with the crude polypeptide in phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 4°C for 2 h (with shaking). The sepharose is then typically packed in a column, thoroughly washed with PBS (typically 10 times the column volume), and eluted with dilute HCL in H<sub>2</sub>O (pH 1.85). The eluate may then be concentrated by lyophylization and its purity checked, for example, by reverse phase HPLC.

#### ANTI-CELL RECEPTOR ANTIBODIES

Cell receptor or receptor fragments of the invention may be used to generate antibodies by any conventional method well known to those skilled in the art, including those which generate polyclonal antibodies and those which generate monoclonal antibodies. For example, the deduced amino acid sequence of the PTH receptor reveals a protein structure that appears to have several transmembrane (i.e., hydrophobic) domains interspersed with presumably extracellular and intracellular regions (see Fig. 21) analogous to those found in other G protein-linked receptors. This information can be used to guide the selection of regions of the receptor protein which would be likely to be exposed on the cell surface, and thus would be presented to antibodies in vivo. A short peptide representing one or more of such regions may be synthesized (e.g., chemically or by recombinant DNA techniques) and used to immunize an animal (e.g., a rabbit or a mouse) to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, certain of the peptides of the PTH/PTHrP receptor listed above (RP-1, RP-5 and RP-6) have been

- 41 -

chemically synthesized using standard techniques and used to generate polyclonal antibodies in rabbits by the following procedure:

A preparation of a given peptide emulsified with  
5 complete Freund's Adjuvant is injected intradermally into rabbits. Booster injections are emulsified in or complete adjuvant and injected at monthly intervals.

Antibody titer is assessed using either of two methods. First, serial dilutions of the antiserum in 1%  
10 normal rabbit serum are incubated with  $^{125}\text{I}$ -labelled PTH/PTHrP receptor fragment by standard methods (e.g., see Segre et al., supra) for 24 h at 4° C. The bound  $^{125}\text{I}$ -PTH/PTHrP receptor fragments are separated from unbound by addition of 100  $\mu\text{l}$  of second antibody (anti-  
15 rabbit IgG, Sigma) diluted 1:20 and 1 ml of 5% polyethylene glycol, followed by centrifugation at 2000 rpm for 30 min. at 4° C. The supernatant is removed and the pellet analyzed for radioactivity in a  $\gamma$ -counter. In the second method, cell lines expressing either native  
20 (e.g., ROS 17/2.8, OK, SaOS-02 cells) or recombinant (COS cells or CHO cells transfected with R15B, OK-O or OK-H) PTH/PTHrP receptors are incubated with serially diluted antibody at 4°C, 20°C or 37°C for 1- 4 h. The cells are rinsed with PBS (x3) and incubated  
25 for 2 h at 4°C with  $^{125}\text{I}$ -labelled (NEN, Dupont) or FITC-labelled (Sigma) second antibodies. After rinsing (x3 with PBS), the cells were either lysed with 0.1 M NaOH and counted in  $\gamma$ -counter (if  $^{125}\text{I}$ -labelled second antibody was used) or fixed with 1% paraformaldehyde and examined  
30 by fluorescent microscopy (if FITC-labelled second antibody was used).

Another method for producing antibodies utilizes as antigen the intact cell receptor protein of the invention expressed on the surface of cells (e.g.,  
35 mammalian cells, such as COS cells, transfected with DNA

- 42 -

encoding the receptor). Such cells are prepared by standard techniques, e.g., by the DEAE-dextran transfection method, using a vector encoding and capable of directing high-level expression of the cell receptor.

- 5 Such cells may be used to generate polyclonal or monoclonal antibodies. For example, monoclonal antibodies specific for the PTH/PTHrP receptor may be produced by the following procedure:

Intact COS cells expressing high levels of rat  
10 recombinant PTH receptors on the cell surface are injected intraperitoneally (IP) into Balb-c mice (Charles River Laboratories, Willmington, MA). The mice are boosted every 4 weeks by IP injection, and are hyperimmunized by an intravenous (IV) booster 3 days  
15 before fusion. Spleen cells from the mice are isolated and are fused by standard methods to myeloma cells. Hybridomas are selected in standard hypoxanthine/aminopterin/thymine (HAT) medium, according to standard methods. Hybridomas secreting antibodies  
20 which recognize the PTH receptor are initially identified by screening with cell lines which naturally express abundant copies of the PTH-receptor per cell (such as ROS17/2.8 or OK cells), using standard immunological techniques. Those hybridomas which produce antibodies  
25 capable of binding to the PTH receptor are cultured and subcloned. Secondary screening with radioreceptor and cAMP stimulation assays can then be performed to further characterize the monoclonal antibodies (see below).

#### SCREENING FOR PTH RECEPTOR ANTAGONISTS AND AGONISTS

- 30 The polypeptides and antibodies of the invention and other compounds may be screened for PTH-competition and for antagonistic or agonistic properties using the assays described herein.

In one example, those antibodies that recognize  
35 the PTH receptor on the intact cells are screened for

- 43 -

their ability to compete with PTH or PTHrP for binding to a PTH/PTHrP receptor. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with the  $^{125}\text{I}$ -PTH analog,  $^{125}\text{I}$ -NlePTH or  $^{125}\text{I}$ -PTHrP in the presence or absence of

5 the polyclonal or monoclonal antibody to be tested, for 4 h at 15°C. The antibody used may be from crude antiserum, cell medium, or ascites, or in purified form. After incubation, the cells are rinsed with binding buffer (e.g., physiological saline), lysed, and

10 quantitatively analyzed for radioactivity using a gamma-counter. Antibodies that reduce binding of the PTH analog to the PTH receptor are classified as competitive; those which do not are noncompetitive.

Compounds, including antibodies and polypeptides,

15 may be screened for their agonistic or antagonistic properties using the cAMP accumulation, intracellular calcium, and/or inositol phosphate assays described above. Cells expressing PTH receptor on the cell surface are incubated with PTH, PTH-receptor antibody, or a

20 combination of both, for 5 - 60 minutes at 37°C, in the presence of 2 mM IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, Sigma, St. Louis, MO). Cyclic AMP accumulation is measured by specific radio-immunoassay, as described above. A compound that competes with PTH for binding to

25 the PTH receptor, and that inhibits the effect of PTH on cAMP accumulation, is considered a competitive PTH antagonist. Conversely, a compound that does not compete for PTH binding to the PTH receptor, but which still prevents PTH activation of cAMP accumulation (presumably

30 by blocking the receptor activation site) is considered a non-competitive antagonist. A compound that competes with PTH for binding to the PTH receptor, and which stimulates cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, is a competitive agonist. A compound that does

35 not compete with PTH for binding to the PTH receptor but

- 44 -

which is still capable of stimulating cAMP accumulation in the presence or absence of PTH, or which stimulates a higher accumulation than that observed by PTH alone, would be considered a non-competitive agonist.

5 USE

The polypeptides, antibodies, and other compounds of the invention are useful for the diagnosis, classification, prognosis, and/or treatment of disorders which may be characterized as related to the interaction  
10 between a cell receptor of the invention and its specific ligand. For example, some forms of hypercalcemia and hypocalcemia are related to the interaction between PTH and PTHrP and the PTH/PTHrP receptor(s). Hypercalcemia is an condition in which there is an abnormal elevation  
15 in serum calcium level; it is often associated with other diseases, including hyperparathyroidism, osteoporosis, carcinomas of the breast, lung and prostate, epidermoid cancers of the head and neck of the esophagus, multiple myeloma, and hypernephroma. Hypocalcemia, a condition in  
20 which the serum calcium level is abnormally low, may result from a deficiency of effective PTH, e.g., following thyroid surgery.

In a first example, the compounds of the invention are used to manufacture diagnostic agents which are used  
25 as diagnostic tools to diagnose hypercalcemia and to distinguish between hypercalcemic conditions, i.e., to differentiate hypercalcemia mediated by PTH or PTHrP (e.g., hyperparathyroidism and humoral hypercalcemia of malignancy), from hypercalcemia associated with diseases  
30 which do not involve these factors (e.g., local osteolytic hypercalcemia mediated by the presence of metastatic tumor cells in direct contact with bone, and certain rare types of malignancy-related hypercalcemias mediated by an increase of humoral factors, such as  
35 osteoclast activating factor (interleukin), lymphotoxin,



- 45 -

calcitriol, type E prostaglandins, and vitamin D-like sterols).

In one method of diagnosis, serum total and/or ionized calcium levels are measured by standard techniques before and after the administration of the PTH or PTHrP antagonists of the invention. PTH or PTHrP related hypercalcemias would be detectable as a decrease in serum calcium levels following administration of the antagonist of the invention. In contrast, for hypercalcemic conditions mediated by factors other than PTH or PTHrP, the serum calcium levels would remain unchanged even after administration of the antagonist.

Another diagnostic application of the invention permits measurement of the level of PTH or PTHrP in a biological sample in order to diagnose PTH or PTHrP related tumors, e.g., tumors which are associated with humoral hypercalcemia of malignancy, and for monitoring the levels of PTH or PTHrP during cancer therapy. This method involves assaying binding of the recombinant parathyroid hormone receptor of the invention to PTH or PTHrP present in a tissue sample, using the binding assay described herein. The level of binding may be determined directly (e.g., by using radioactively labelled PTH receptor, and assaying the radioactivity bound to endogenous PTH). Alternatively, binding of PTH receptor to the sample (e.g., a tissue section) may be followed by staining of the tissue sections with an antibody specific for the PTH receptor, using standard immunological techniques (Chin et al., Hybridoma 5:339, 1986).

In a third diagnostic approach, one could stably transfect cell lines (by the methods described in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Publishers, New York, 1987) with a PTH receptor gene linked to an appropriate promoter (e.g., the metallothionine promoter). Alternatively, the PTH/PTHrP

- 46 -

receptor could be expressed from a eukaryotic vector, i.e., pcDNAI, and cotransfected with a mutant DHFR gene that will allow further gene amplification via methotrexate selection (Simonsen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80:2495-2499, 1983). Such high-level expression of the gene produces an immortal cell line which is oversensitive to PTH or PTHrP. Such cells provide a particularly useful tool for detecting serum blood levels of PTH or PTHrP. Such a cell line may be used for diagnosis of conditions involving elevated PTH or PTHrP levels (e.g., those described above) or for conditions involving unusually low levels of PTH or PTHrP (e.g., those described above). Such a cell line is also useful for monitoring the regression or increase of PTH or PTHrP levels during therapy for hypercalcemia or hypocalcemia, respectively.

A patient who is suspected of being hypercalcemic may be treated using the compounds of the invention. Rapid intervention is important because symptoms may appear abruptly and, unless reversed, can be fatal. In one application, serum calcium levels are stabilized by an immediate course of treatment which includes antagonists of PTH or PTHrP. Such antagonists include the compounds of the invention which have been determined (by the assays described herein) to interfere with PTH receptor-mediated cell activation. To administer the antagonist, the appropriate antibody or peptide (is used in the manufacture of a medicament, generally by being formulated in an appropriate carrier such as physiological saline, and administered intravenously, at a dosage that provides adequate competition for PTH or PTHrP binding to the PTH receptor (e.g., a dosage sufficient to lower the serum calcium level to below 10 mg/dl). Typical dosage would be 1 ng to 10 mg of the antibody or peptide per kg body weight per day.

- 47 -

Treatment may be repeated as necessary for long term maintenance of acceptable calcium levels (i.e., levels < 10.1 mg/dl). This may be necessary for acute treatment of an underlying disease condition triggering

5 hypercalcemia; or it may be used, e.g., for chronic treatment of conditions such as osteoporosis.

In another application, the compounds of the invention which have been characterized, according to the methods of the invention, to be agonists are used

10 therapeutically to treat hypocalcemia: e.g., that resulting from the partial or complete surgical removal of the parathyroid glands. Agonists may be formulated in a suitable carrier (e.g., physiological saline) and are preferably administered intravenously in a dosage that

15 causes a rise in serum calcium to an acceptable level (i.e., approximately 8 mg/dl). A useful dosage range would be 1 ng to 10 mg of the agonist per kg body weight per day. Treatment may be repeated as necessary to maintain suitable serum calcium levels; long term

20 treatment may be necessary for patients who have undergone parathyroid gland removal.

The nucleic acids of the invention may also be used therapeutically. Oligonucleotides which are antisense to PTH receptor mRNA (or nucleic acid

25 constructs which express RNA that is antisense to PTH receptor mRNA) may be utilized as an anticancer therapy. This approach is useful, e.g., for hypercalcemias resulting from a genomic rearrangement or amplification which increases the amount or activity of PTH receptor,

30 PTH or PTHrP. The method would involve introduction of the antisense oligonucleotide into the tumor cells in vivo. The antisense strand hybridizes with endogenous PTH receptor mRNA, interfering with translation of the protein, thereby reducing production of PTH receptor in

35 such cells, and reducing PTH/PTHrP-associated neoplastic

- 48 -

growth. Methods for antisense design and introduction into host cells are described, for example, in Weinberg et al., U.S. Patent No. 4,740,463, herein incorporated by reference. The biochemical characterization of the OK-H, OK-O and R15B PTH/PTHrP receptors of the invention demonstrate that the two transduction pathways now known to be triggered by the interaction of PTH with its receptor are distinct and may be separated. The predicted amino acid sequences of these receptors indicate that OK-H, which does not appear to activate inositol phosphate metabolism to any detectable degree, is 70 amino acids shorter at the carboxy-terminus than OK-O or R15B. By using the sequences of the invention and the information disclosed herein, one could clone and then alter (e.g. by site-directed mutagenesis) PTH/PTHrP receptor genes from any species to generate PTH/PTHrP receptors which do not activate phospholipase C. This could potentially allow the separation of different PTH-mediated actions, including bone resorption and bone formation, and could of great importance for the treatment of various bone disorders such as osteoporosis.

Nucleic acids of the invention which encode a PTH receptor may also be linked to a selected tissue-specific promoter and/or enhancer and the resultant hybrid gene introduced, by standard methods (e.g., as described by Leder et al., U.S. Patent No. 4,736,866, herein incorporated by reference), into an animal embryo at an early developmental stage (e.g., the fertilized oocyte stage), to produce a transgenic animal which expresses elevated levels of PTH receptor in selected tissues (e.g., the osteocalcin promoter for bone). Such promoters are used to direct tissue-specific expression of the PTH receptor in the transgenic animal. The form of PTH receptor utilized can be one which encodes a PTH receptor similar to that of the animal species used, or

- 49 -

it can encode the PTH receptor homolog of a different species. In one particular example, transgenic chickens are engineered to express the PTH receptor from a promoter which directs high-level expression in chicken oviducts. Such an animal is expected to produce eggs with higher calcium content, and thus harder shells.

#### Other Embodiments

Other embodiments are within the following claims. For example, the nucleic acid of the invention includes genes or cDNAs or RNAs originally isolated from any vertebrate species, including birds or mammals such as marsupials, rodents, or humans. The high degree of homology demonstrated for the PTH receptors from such diverse species as opossum, rat, and human indicates that the methods of isolating PTH receptors disclosed herein will be broadly applicable to the isolation of related cell receptors from a wide variety of species.

- 50 -

COMPUTER SUBMISSION OF DNA AND AMINO ACID SEQUENCES

## (1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Segre, Gino V.  
Kronenberg, Henry M.  
Abou-Samra, Abdul-Badi  
Juppner, Harald  
Potts, John T., Jr.  
Schipani, Ernestina
- (ii) TITLE OF INVENTION: PARATHYROID HORMONE RECEPTOR AND DNA  
ENCODING SAME
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 3
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
- (A) ADDRESSEE: Fish & Richardson  
(B) STREET: 225 Franklin Street  
(C) CITY: Boston  
(D) STATE: Massachusetts  
(E) COUNTRY: U.S.A.  
(F) ZIP: 02110-2804
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
- (A) MEDIUM TYPE: 3.5" Diskette, 1.44 Mb storage  
(B) COMPUTER: IBM PS/2 Model 50Z or 55SX  
(C) OPERATING SYSTEM: IBM P.C. DOS (Version 3.30)  
(D) SOFTWARE: WordPerfect (Version 5.0)
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER:  
(B) FILING DATE:  
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
- (A) APPLICATION NUMBER: 07/681,702  
(B) FILING DATE: April 5, 1991
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
- (A) NAME: Paul T. Clark  
(B) REGISTRATION NUMBER: 30,162  
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 00786/071001
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
- (A) TELEPHONE: (617) 542-5070  
(B) TELEFAX: (617) 542-8906

- 51 -

(C) TELEX: 200154

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH:1862  
 (B) TYPE:nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS:double  
 (D) TOPOLOGY:linear

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 1:

|   |     |
|---|-----|
| TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG | 60  |
| GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC   | 115 |
| Met Gly Ala Pro Arg Ile   |     |
| 1 5   |     |
| TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC   | 163 |
| Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val   |     |
| 10 15 20  |     |
| TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC   | 211 |
| Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile   |     |
| 25 30 35  |     |
| ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG   | 259 |
| Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu   |     |
| 40 45 50  |     |
| GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA   | 307 |
| Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser   |     |
| 55 60 65 70   |     |
| AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC   | 355 |
| Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro   |     |
| 75 80 85  |     |
| CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT   | 403 |
| Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp   |     |
| 90 95 100   |     |
| GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA   | 451 |
| Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly   |     |
| 105 110 115   |     |
| GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC   | 499 |
| Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp   |     |
| 120 125 130   |     |
| TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC   | 547 |
| Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser   |     |
| 135 140 145 150   |     |

- 52 -

|   |      |
|---|------|
| TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA | 595  |
| Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu |      |
| 155 160 165   |      |
| TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT | 643  |
| Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp |      |
| 170 175 180   |      |
| CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC | 691  |
| Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser |      |
| 185 190 195   |      |
| CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC | 739  |
| Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys |      |
| 200 205 210   |      |
| ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG | 787  |
| Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg |      |
| 215 220 225 230   |      |
| GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC | 835  |
| Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser |      |
| 235 240 245   |      |
| ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA | 883  |
| Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr |      |
| 250 255 260   |      |
| GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG | 931  |
| Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala |      |
| 265 270 275   |      |
| GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG | 979  |
| Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu |      |
| 280 285 290   |      |
| GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT | 1027 |
| Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser |      |
| 295 300 305 310   |      |
| GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT | 1075 |
| Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro |      |
| 315 320 325   |      |
| GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC | 1123 |
| Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn |      |
| 330 335 340   |      |
| ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG | 1171 |
| Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln |      |
| 345 350 355   |      |



- 53 -

|   |      |
|---|------|
| GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT   | 1219 |
| Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn   |      |
| 360 365 370   |      |
| ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA   | 1267 |
| Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg   |      |
| 375 380 385 390   |      |
| TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC   | 1315 |
| Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val   |      |
| 395 400 405   |      |
| CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG   | 1363 |
| Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro   |      |
| 410 415 420   |      |
| TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA   | 1411 |
| Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu   |      |
| 425 430 435   |      |
| ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT   | 1459 |
| Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys   |      |
| 440 445 450   |      |
| TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA   | 1507 |
| Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg   |      |
| 455 460 465 470   |      |
| TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT   | 1555 |
| Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser   |      |
| 475 480 485   |      |
| ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG   | 1603 |
| Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val   |      |
| 490 495 500   |      |
| GGA CCT CGA GGG GGC TGG CCT TGT CCC TCA GCC CTC GAC TAGCTCCTGG    | 1652 |
| Gly Pro Arg Gly Gly Trp Pro Cys Pro Ser Ala Leu Asp               |      |
| 505 510 515   |      |
| GGCTGGAGCC AGTGCCAATG GCCATCACCA GTTGCCTGGC TATGTGAAGC ATGGTTCCAT | 1712 |
| TTCTGAGAAC TCATTGCCTT CATCTGGCCC AGAGCCTGGC ACCAAAGATG ACGGGTATCT | 1772 |
| CAATGGCTCT GGACTTTATG AGCCAATGGT TGGGGAACAG CCCCCTCCAC TCCTGGAGGA | 1832 |
| GGAGAGAGAG ACAGTCATGT GACCCATATC                                  | 1862 |

- 54 -

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 2:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

(A) LENGTH: 1863  
 (B) TYPE: nucleic acid  
 (C) STRANDEDNESS: single  
 (D) TOPOLOGY: linear

## (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 2:

```

TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG   60
GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC   115
                               Met Gly Ala Pro Arg Ile
                               1           5

TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC   163
Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val
          10              15              20

TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC   211
Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile
          25              30              35

ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG   259
Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu
          40              45              50

GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA   307
Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser
          55              60              65              70

AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC   355
Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro
          75              80              85

CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT   403
Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp
          90              95              100

GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA   451
Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly
          105              110              115

GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC   499
Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp
          120              125              130

```

- 55 -

|   |      |
|---|------|
| TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC | 547  |
| Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser |      |
| 135 140 145 150   |      |
| TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA | 595  |
| Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu |      |
| 155 160 165   |      |
| TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT | 643  |
| Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp |      |
| 170 175 180   |      |
| CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC | 691  |
| Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser |      |
| 185 190 195   |      |
| CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC | 739  |
| Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys |      |
| 200 205 210   |      |
| ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG | 787  |
| Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg |      |
| 215 220 225 230   |      |
| GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC | 835  |
| Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser |      |
| 235 240 245   |      |
| ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA | 883  |
| Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr |      |
| 250 255 260   |      |
| GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG | 931  |
| Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala |      |
| 265 270 275   |      |
| GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG | 979  |
| Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu |      |
| 280 285 290   |      |
| GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT | 1027 |
| Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser |      |
| 295 300 305 310   |      |
| GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT | 1075 |
| Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro |      |
| 315 320 325   |      |
| GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC | 1123 |
| Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn |      |
| 330 335 340   |      |

- 56 -

|   |      |
|---|------|
| ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG | 1171 |
| Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln |      |
| 345 350 355   |      |
| GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT | 1219 |
| Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn |      |
| 360 365 370   |      |
| ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA | 1267 |
| Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg |      |
| 375 380 385 390   |      |
| TGT GAC ACG AGG CAA CAG TAT AGA AAG CTG CTG AAG TCC ACG CTA GTC | 1315 |
| Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Lys Ser Thr Leu Val |      |
| 395 400 405   |      |
| CTC ATG CCG CTA TTT GGG GTG CAC TAC ATC GTC TTC ATG GCC ACG CCG | 1363 |
| Leu Met Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Ile Val Phe Met Ala Thr Pro |      |
| 410 415 420   |      |
| TAC ACA GAA GTA TCA GGG ATT CTT TGG CAA GTC CAA ATG CAC TAT GAA | 1411 |
| Tyr Thr Glu Val Ser Gly Ile Leu Trp Gln Val Gln Met His Tyr Glu |      |
| 425 430 435   |      |
| ATG CTC TTC AAT TCA TTC CAG GGA TTT TTC GTT GCC ATT ATA TAC TGT | 1459 |
| Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys |      |
| 440 445 450   |      |
| TTC TGC AAT GGA GAG GTA CAA GCA GAG ATC AAG AAG TCA TGG AGC CGA | 1507 |
| Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Lys Lys Ser Trp Ser Arg |      |
| 455 460 465 470   |      |
| TGG ACC CTG GCC TTG GAC TTC AAG CGG AAG GCC CGG AGT GGC AGC AGT | 1555 |
| Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser |      |
| 475 480 485   |      |
| ACC TAC AGC TAT GGC CCC ATG GTG TCA CAT ACA AGT GTC ACC AAT GTG | 1603 |
| Thr Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val |      |
| 490 495 500   |      |
| GGA CCT CGA GGG GGG CTG GCC TTG TCC CTC AGC CCT CGA CTA GCT CCT | 1651 |
| Gly Pro Arg Gly Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ser Pro Arg Leu Ala Pro |      |
| 505 510 515   |      |
| GGG GCT GGA GCC AGT GCC AAT GGC CAT CAC CAG TTG CCT GGC TAT GTG | 1699 |
| Gly Ala Gly Ala Ser Ala Asn Gly His His Gln Leu Pro Gly Tyr Val |      |
| 520 525 530   |      |
| AAG CAT GGT TCC ATT TCT GAG AAC TCA TTG CCT TCA TCT GGC CCA GAG | 1747 |
| Lys His Gly Ser Ile Ser Glu Asn Ser Leu Pro Ser Ser Gly Pro Glu |      |
| 535 540 545 550   |      |

- 57 -

|   |      |
|---|------|
| CCT GGC ACC AAA GAT GAC GGG TAT CTC AAT GGC TCT GGA CTT TAT GAG | 1795 |
| Pro Gly Thr Lys Asp Asp Gly Tyr Leu Asn Gly Ser Gly Leu Tyr Glu |      |
| 555 560 565   |      |
|   |      |
| CCA ATG GTT GGG GAA CAG CCC CCT CCA CTC CTG GAG GAG GAG AGA GAG | 1843 |
| Pro Met Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Leu Leu Glu Glu Glu Arg Glu |      |
| 570 575 580   |      |
|   |      |
| ACA GTC ATG TGACCCATAT C  | 1863 |
| Thr Val Met   |      |
| 585   |      |

(2) INFORMATION FOR SEQUENCE IDENTIFICATION NUMBER: 3:

## (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

|                   |              |
|-------------------|--------------|
| (A) LENGTH:       | 2051         |
| (B) TYPE:         | nucleic acid |
| (C) STRANDEDNESS: | double       |
| (D) TOPOLOGY:     | linear       |

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQUENCE ID NO: 3:

|   |     |
|---|-----|
| GGCGGGGGCC GCGGCGGCGA GCTCGGAGGC CGGCGGCGGC TGCCCCGAGG GACGCGGCCC | 60  |
| TAGGCGGTGG CG ATG GGG GCC GCC CGG ATC GCA CCC AGC CTG GCG CTC     | 108 |
| Met Gly Ala Ala Arg Ile Ala Pro Ser Leu Ala Leu                   |     |
| 1 5 10  |     |
|   |     |
| CTA CTC TGC TGC CCA GTG CTC AGC TCC GCA TAT GCG CTG GTG GAT GCG   | 156 |
| Leu Leu Cys Cys Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Val Asp Ala   |     |
| 15 20 25  |     |
|   |     |
| GAC GAT GTC TTT ACC AAA GAG GAA CAG ATT TTC CTG CTG CAC CGT GCC   | 204 |
| Asp Asp Val Phe Thr Lys Glu Glu Gln Ile Phe Leu Leu His Arg Ala   |     |
| 30 35 40  |     |
|   |     |
| CAG GCG CAA TGT GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG CAC ACA GCA GCC   | 252 |
| Gln Ala Gln Cys Asp Lys Leu Leu Lys Glu Val Leu His Thr Ala Ala   |     |
| 45 50 55 60   |     |
|   |     |
| AAC ATA ATG GAG TCA GAC AAG GGC TGG ACA CCA GCA TCT ACG TCA GGG   | 300 |
| Asn Ile Met Glu Ser Asp Lys Gly Trp Thr Pro Ala Ser Thr Ser Gly   |     |
| 65 70 75  |     |
|   |     |
| AAG CCC AGG AAA GAG AAG GCA TCG GGA AAG TTC TAC CCT GAG TCT AAA   | 348 |
| Lys Pro Arg Lys Glu Lys Ala Ser Gly Lys Phe Tyr Pro Glu Ser Lys   |     |
| 80 85 90  |     |
|   |     |
| GAG AAC AAG GAC GTG CCC ACC GGC AGC AGG CGC AGA GGG CGT CCC TGT   | 396 |
| Glu Asn Lys Asp Val Pro Thr Gly Ser Arg Arg Arg Gly Arg Pro Cys   |     |
| 95 100 105  |     |

- 58 -

|   |      |
|---|------|
| CTG CCC GAG TGG GAC AAC ATC GTT TGC TGG CCA TTA GGG GCA CCA GGT | 444  |
| Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Leu Gly Ala Pro Gly |      |
| 110 115 120   |      |
| GAA GTG GTG GCA GTA CCT TGT CCC GAT TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC | 492  |
| Glu Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Ile Tyr Asp Phe Asn His |      |
| 125 130 135 140   |      |
| AAA GGC CAT GCC TAC AGA CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG GTG | 540  |
| Lys Gly His Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Arg Asn Gly Ser Trp Glu Val |      |
| 145 150 155   |      |
| GTT CCA GGG CAC AAC CGG ACG TGG GCC AAC TAC AGC GAG TGC CTC AAG | 588  |
| Val Pro Gly His Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu Cys Leu Lys |      |
| 160 165 170   |      |
| TTC ATG ACC AAT GAG ACG CGG GAA CGG GAG GTA TTT GAC CGC CTA GGC | 636  |
| Phe Met Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp Arg Leu Gly |      |
| 175 180 185   |      |
| ATG ATC TAC ACC GTG GGA TAC TCC ATG TCT CTC GCC TCC CTC ACG GTG | 684  |
| Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Met Ser Leu Ala Ser Leu Thr Val |      |
| 190 195 200   |      |
| GCT GTG CTC ATC CTG GCC TAT TTT AGG CGG CTG CAC TGC ACG CGC AAC | 732  |
| Ala Val Leu Ile Leu Ala Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys Thr Arg Asn |      |
| 205 210 215 220   |      |
| TAC ATC CAC ATG CAC ATG TTC CTG TCG TTT ATG CTG CGC GCC GCG AGC | 780  |
| Tyr Ile His Met His Met Phe Leu Ser Phe Met Leu Arg Ala Ala Ser |      |
| 225 230 235   |      |
| ATC TTC GTG AAG GAC GCT GTG CTC TAC TCT GGC TTC ACG CTG GAT GAG | 828  |
| Ile Phe Val Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Asp Glu |      |
| 240 245 250   |      |
| GCC GAG CGC CTC ACA GAG GAA GAG TTG CAC ATC ATC GCG CAG GTG CCA | 876  |
| Ala Glu Arg Leu Thr Glu Glu Glu Leu His Ile Ile Ala Gln Val Pro |      |
| 255 260 265   |      |
| CCT CCG CCG GCC GCT GCC GCC GTA GGC TAC GCT GGC TGC CGC GTG GCG | 924  |
| Pro Pro Pro Ala Ala Ala Val Gly Tyr Ala Gly Cys Arg Val Ala     |      |
| 270 275 280   |      |
| GTG ACC TTC TTC CTC TAC TTC CTG GCT ACC AAC TAC TAC TGG ATT CTG | 972  |
| Val Thr Phe Phe Leu Tyr Phe Leu Ala Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu |      |
| 285 290 295 300   |      |
| GTG GAG GGG CTG TAC TTG CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCC TTT TTC TCA | 1020 |
| Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser |      |
| 305 310 315   |      |

- 59 -

|   |      |
|---|------|
| GAG AAG AAG TAC CTG TGG GGC TTC ACC ATC TTT GGC TGG GGT CTA CCG | 1068 |
| Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Ile Phe Gly Trp Gly Leu Pro |      |
| 320 325 330   |      |
| GCT GTC TTC GTG GCT GTG TGG GTC GGT GTC AGA GCA ACC TTG GCC AAC | 1116 |
| Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Gly Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn |      |
| 335 340 345   |      |
| ACT GGG TGC TGG GAT CTG AGC TCC GGG CAC AAG AAG TGG ATC ATC CAG | 1164 |
| Thr Gly Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly His Lys Lys Trp Ile Ile Gln |      |
| 350 355 360   |      |
| GTG CCC ATC CTG GCA TCT GTT GTG CTC AAC TTC ATC CTT TTT ATC AAC | 1212 |
| Val Pro Ile Leu Ala Ser Val Val Leu Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn |      |
| 365 370 375 380   |      |
| ATC ATC CGG GTG CTT GCC ACT AAG CTT CGG GAG ACC AAT GCG GGC CGG | 1260 |
| Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg |      |
| 385 390 395   |      |
| TGT GAC ACC AGG CAG CAG TAC CGG AAG CTG CTC AGG TCC ACG TTG GTG | 1308 |
| Cys Asp Thr Arg Gln Gln Tyr Arg Lys Leu Leu Arg Ser Thr Leu Val |      |
| 400 405 410   |      |
| CTC GTG CCG CTC TTT GGT GTC CAC TAC ACC GTC TTC ATG GCC TTG CCG | 1356 |
| Leu Val Pro Leu Phe Gly Val His Tyr Thr Val Phe Met Ala Leu Pro |      |
| 415 420 425   |      |
| TAC ACC GAG GTC TCA GGG ACA TTG TGG CAG ATC CAG ATG CAT TAT GAG | 1404 |
| Tyr Thr Glu Val Ser Gly Thr Leu Trp Gln Ile Gln Met His Tyr Glu |      |
| 430 435 440 445   |      |
| ATG CTC TTC AAC TCC TTC CAG GGA TTT TTT GTT GCC ATC ATA TAC TGT | 1452 |
| Met Leu Phe Asn Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ala Ile Ile Tyr Cys |      |
| 450 455 460   |      |
| TTC TGC AAT GGT GAG GTG CAG GCA GAG ATT AGG AAG TCA TGG AGC CGC | 1500 |
| Phe Cys Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Ile Arg Lys Ser Trp Ser Arg |      |
| 465 470 475   |      |
| TGG ACA CTG GCG TTG GAC TTC AAG CGC AAA GCA CGA AGT GGG AGT AGC | 1548 |
| Trp Thr Leu Ala Leu Asp Phe Lys Arg Lys Ala Arg Ser Gly Ser Ser |      |
| 480 485 490   |      |
| AGC TAC AGC TAT GGC CCA ATG GTG TCT CAC ACG AGT GTG ACC AAT GTG | 1596 |
| Ser Tyr Ser Tyr Gly Pro Met Val Ser His Thr Ser Val Thr Asn Val |      |
| 495 500 505   |      |
| GGC CCC CGT GCA GGA CTC AGC CTC CCC CTC AGC CCC CGC CTG CCT CCT | 1644 |
| Gly Pro Arg Ala Gly Leu Ser Leu Pro Leu Ser Pro Arg Leu Pro Pro |      |
| 510 515 520 525   |      |

- 60 -

|   |      |
|---|------|
| GCC ACT ACC AAT GGC CAC TCC CAG CTG CCT GGC CAT GCC AAG CCA GGG   | 1692 |
| Ala Thr Thr Asn Gly His Ser Gln Leu Pro Gly His Ala Lys Pro Gly   |      |
| 530 535 540   |      |
| GCT CCA GCC ACT GAG ACT GAA ACC CTA CCA GTC ACT ATG GCG GTT CCC   | 1740 |
| Ala Pro Ala Thr Glu Thr Glu Thr Leu Pro Val Thr Met Ala Val Pro   |      |
| 545 550 555   |      |
| AAG GAC GAT GGA TTC CTT AAC GGC TCC TGC TCA GGC CTG GAT GAG GAG   | 1788 |
| Lys Asp Asp Gly Phe Leu Asn Gly Ser Cys Ser Gly Leu Asp Glu Glu   |      |
| 560 565 570   |      |
| GCC TCC GGG TCT GCG CGG CCG CCT CCA TTG TTG CAG GAA GGA TGG GAA   | 1836 |
| Ala Ser Gly Ser Ala Arg Pro Pro Pro Leu Leu Gln Glu Gly Trp Glu   |      |
| 575 580 585   |      |
| ACA GTC ATG TGA CTGGGCA CTAGGGGGCT AGACTGCTGG CCTGGGCACA          | 1885 |
| Thr Val Met   |      |
| 590   |      |
| TGGACAGATG GACCAAGAAG CCAGTGTTTG GCTGGTTGTC TATTCGGGAT CTGGACCAGG | 1945 |
| AAGATAACAA AAGGAAAATG GAAGTGGACG AAGCAGAGAA GAAGGAAGAG GTTTTGCAGG | 2005 |
| AATTAAATAT GTTTCCTCAG TTGGATGATG AGGACACAAG GAAGGC                | 2051 |

What is claimed is:



- 61 -

Claims

1           1.     Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2 encoding a cell receptor of a vertebrate animal, said  
3 receptor having an amino acid sequence with at least 30%  
4 identity to the amino acid sequence shown in FIG. 3.

1           2.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3 sequence shown in FIG. 1 (SEQ. ID NO. 1).

1           3.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3 sequence shown in FIG. 3 (SEQ. ID NO. 3).

1           4.     The isolated DNA of claim 1, said isolated  
2 DNA being (8A6), deposited with the ATCC and designated  
3 ATCC Accession No. 68570.

1           5.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence encodes substantially all of the amino acid  
3 sequence shown in Fig. 6 (SEQ. ID. NO. 4).

1           6.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3 1 (SEQ. ID NO. 1).

1           7.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3 3 (SEQ. ID NO. 3).

1           8.     The isolated DNA of claim 1, wherein said  
2 DNA sequence hybridizes to the DNA sequence shown in Fig.  
3 6 (SEQ. ID NO. 4).

- 62 -

1           9.    A purified preparation of a vector, said  
2 vector comprising a DNA sequence encoding a parathyroid  
3 hormone receptor.

1           10.   A cell containing the isolated DNA of claim  
2 1.

1           11.   The cell of claim 10, wherein said cell is  
2 capable of expressing said cell receptor from said  
3 isolated DNA.

1           12.   An essentially homogenous population of  
2 cells, each of which comprises the isolated DNA of claim  
3 1.

1           13.   Isolated DNA comprising a DNA sequence  
2 encoding a polypeptide capable of binding parathyroid  
3 hormone or parathyroid-hormone-related protein.

1           14.   A method for producing a polypeptide, said  
2 method comprising:

3                providing a cell comprising isolated DNA  
4 encoding a parathyroid hormone receptor or a fragment  
5 thereof; and

6                culturing said cell under conditions  
7 permitting expression of a polypeptide from said DNA.

1           15.   A single-stranded DNA comprising a portion  
2 of a parathyroid hormone receptor gene, said portion  
3 being at least 18 nucleotides long.

1           16.   The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2 said portion is less than all of said parathyroid hormone  
3 receptor gene.

- 63 -

1           17. The single-stranded DNA of claim 15, wherein  
2 said DNA is detectably labeled.

1           18. A single-stranded DNA comprising a portion  
2 of a parathyroid hormone receptor cDNA, said portion  
3 being at least 18 nucleotides long.

1           19. The single-stranded DNA of claim 18, wherein  
2 said DNA is antisense.

1           20. Parathyroid hormone receptor produced by  
2 expression of a recombinant DNA molecule encoding a  
3 parathyroid hormone receptor.

1           21. An essentially purified preparation of the  
2 parathyroid hormone receptor of claim 20.

1           22. An essentially purified preparation of the  
2 parathyroid receptor produced by the expression of the  
3 DNA of claim 5.

1           23. A polypeptide comprising at least six amino  
2 acids and less than the complete amino acid sequence of a  
3 parathyroid hormone receptor, said polypeptide capable of  
4 binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
5 related protein.

1           24. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2 parathyroid hormone receptor is a human parathyroid  
3 receptor.

1           25. The polypeptide of claim 23, wherein said  
2 fragment comprises

3           (a) TNETREREVFDRLGMIYTVG,

4           (b) YLYSGFTLDEAERLTEEEL,

- 64 -

- 5 (c) VTFFLYFLATNYYWILVEG,  
6 (d) Y-RATLANTGCWDLSSGHKKWIIQVP,  
7 (e) PYTEYSGTLWQIQMHYEM,  
8 (f) DDVFTKEEQIFLLHRAQA,  
9 (g) FFRLHCTRNY,  
10 (h) EKKYLWGFTL,  
11 (i) VLATKLRETNAGRCDTRQQYRKLLK, or  
12 (j) a fragment of (a) - (i) which is capable of  
13 binding parathyroid hormone or parathyroid hormone-  
14 related protein.

1 26. A therapeutic composition comprising, in a  
2 pharmaceutically-acceptable carrier, (a) a parathyroid  
3 hormone receptor or (b) a polypeptide comprising a  
4 fragment of said receptor.

1 27. An antibody capable of forming an immune  
2 complex with a parathyroid hormone receptor.

1 28. A therapeutic composition comprising the  
2 antibody of claim 27 and a pharmaceutically-acceptable  
3 carrier.

1 29. A method of reducing the level of calcium in  
2 the blood of a mammal, which method comprises  
3 administering the therapeutic composition of claim 26 to  
4 said mammal in a dosage effective to inhibit activation  
5 by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6 protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1 30. A method of reducing the level of calcium in  
2 the blood of a mammal, which method comprises  
3 administering the therapeutic composition of claim 28 to  
4 said mammal in a dosage effective to inhibit activation

- 65 -

5 by parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
6 protein of a parathyroid hormone receptor of said mammal.

1           31. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:  
4           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
5 a parathyroid hormone, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and  
7           (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 polypeptide to said parathyroid hormone in the presence  
9 of said candidate compound, with (ii) the level of  
10 binding of said polypeptide to said parathyroid hormone  
11 in the absence of said candidate compound; a lower level  
12 of binding in the presence of said candidate compound  
13 than in its absence indicating that said candidate  
14 compound is capable of competing with said parathyroid  
15 hormone for binding to said receptor.

1           32. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone-related protein  
3 for binding to a parathyroid hormone receptor, said  
4 method comprising:  
5           (a) contacting the polypeptide of claim 23 with  
6 a parathyroid hormone-related protein, (i) in the  
7 presence or (ii) in the absence of a candidate compound;  
8 and  
9           (b) comparing (i) the level of binding of said  
10 polypeptide to said parathyroid hormone-related protein  
11 in the presence of said candidate compound, with (ii) the  
12 level of binding of said polypeptide to said parathyroid  
13 hormone-related protein in the absence of said candidate  
14 compound; a lower level of binding in the presence of  
15 said candidate compound than in its absence indicating  
16 that said candidate compound is capable of competing with

- 66 -

17 said parathyroid hormone-related protein for binding to  
18 said receptor.

1 33. A method for identifying a compound capable  
2 of competing with a parathyroid hormone for binding to a  
3 parathyroid hormone receptor, said method comprising:

4 (a) combining a parathyroid hormone with the  
5 cell of claim 11, (i) in the presence or (ii) in the  
6 absence of a candidate compound; and

7 (b) comparing (i) the level of binding of said  
8 receptor to said parathyroid hormone in the presence of  
9 said candidate compound, with (ii) the level of binding  
10 of said receptor to said parathyroid hormone in the  
11 absence of said candidate compound; a lower level of  
12 binding in the presence of said candidate compound than  
13 in its absence indicating that said candidate compound is  
14 capable of competing with said parathyroid hormone for  
15 binding to said receptor.

1 34. A compound capable of inhibiting the binding  
2 of parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
3 protein to a parathyroid receptor on the surface of a  
4 cell.

1 35. A therapeutic composition comprising the  
2 compound of claim 34 and a pharmaceutically-acceptable  
3 carrier.

1 36. A method for identifying a DNA sequence  
2 homologous to a parathyroid hormone receptor-encoding DNA  
3 sequence, said method comprising:

4 providing a genomic or cDNA library;  
5 contacting said library with the single-  
6 stranded DNA of claim 18, under conditions permitting

- 67 -

7 hybridization between said single-stranded DNA and a  
8 homologous DNA sequence in said library; and  
9 identifying a clone from said library which  
10 hybridizes to said single-stranded DNA, said  
11 hybridization being indicative of the presence in said  
12 clone of a DNA sequence homologous to a parathyroid  
13 hormone receptor-encoding DNA sequence.

1 37. A transgenic non-human vertebrate animal  
2 bearing a transgene comprising a DNA sequence encoding  
3 parathyroid hormone receptor or a fragment thereof.

1 38. A diagnostic method comprising:

2 (a) obtaining a first blood sample from an  
3 animal; (b) administering the composition of claim  
4 35 to said animal;

5 (c) obtaining a second blood sample from said  
6 animal subsequent to said administration of said  
7 composition; and

8 (d) comparing the calcium level in said first  
9 blood sample with that in said second blood sample, a  
10 lower calcium level in said second blood sample being  
11 diagnostic for a parathyroid hormone-related condition.

12 39. The isolated DNA of claim 1, wherein said  
13 DNA sequence encodes a parathyroid hormone receptor.

1

2 40. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
3 for use in therapy or diagnosis.

4 41. The polypeptide of claim 23 for use in  
5 therapy or diagnosis.

6 42. The antibody of claim 27 for use in therapy  
7 or diagnosis.

- 68 -

8           43. The therapeutic composition of claim 26 for  
9 use in therapy for the inhibition of activation by  
10 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
11 protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
12 for the reduction of the level of calcium in the blood of  
13 a mammal.

14           44. The therapeutic composition of claim 28 for  
15 use in therapy for the inhibition of activation by  
16 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
17 protein of a parathyroid hormone receptor of a mammal or  
18 for the reduction of the level of calcium in the blood of  
19 a mammal.

20           45. The parathyroid hormone receptor of claim 20  
21 for use in the manufacture of a medicament for use in  
22 therapy for the inhibition of activation by parathyroid  
23 hormone or parathyroid hormone-related protein of a  
24 parathyroid hormone receptor of a mammal or for the  
25 reduction of the level of calcium in the blood of a  
26 mammal.

27           46. The polypeptide of claim 23 for use in the  
28 manufacture of a medicament for use in therapy for the  
29 inhibition of activation by parathyroid hormone or  
30 parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
31 hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
32 level of calcium in the blood of a mammal.

33           47. The antibody of claim 27 for use in the  
34 manufacture of a medicament for use in therapy for the  
35 inhibition of activation by parathyroid hormone or  
36 parathyroid hormone-related protein of a parathyroid  
37 hormone receptor of a mammal or for the reduction of the  
38 level of calcium in the blood of a mammal.



- 69 -

39           48. A method for identifying a hypercalcemic  
40 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
41 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
42 method comprising

43           (a) determining the calcium level of a first  
44 blood sample from the patient,

45           (b) determining the calcium level of a second  
46 blood sample from the patient taken at a time subsequent  
47 after administration of the therapeutic composition of  
48 claim 26, and

49           (c) comparing the calcium levels of the two  
50 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
51 sample being indicative of a condition related to  
52 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
53 protein in the patient.

54           49. A method for identifying a hypercalcemic  
55 condition in a patient which is mediated by parathyroid  
56 hormone or parathyroid hormone-related protein, the  
57 method comprising

58           (a) determining the calcium level of a first  
59 blood sample from the patient,

60           (b) determining the calcium level of a second  
61 blood sample from the patient taken at a subsequent time  
62 after administration of the therapeutic composition of  
63 claim 28, and

64           (c) comparing the calcium levels of the two  
65 blood samples, a lower calcium level in the second blood  
66 sample being indicative of a condition related to  
67 parathyroid hormone or parathyroid hormone-related  
68 protein in the patient.

1/30

1 of 3

FIG. 1

|   |                 |            |            |                         |            |    |
|---|-----------------|------------|------------|-------------------------|------------|----|
| TGGGCACAGC  | CACCCTGTTG      | GTAGTCCAGG | GGCCAGCCCA | CTGAGCTGGC              | ATATCAGCTG | 60 |
| GTGGCCCCGT  | TGGA CTGGC      | CCTAGGGAAC | GGCGGCG    | ATG GGA GCG CCC CGG ATC | 115        |    |
|   |                 |            |            | Met Gly Ala Pro Arg Ile |            |    |
|   |                 |            |            | 1 5                     |            |    |
| TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC | 150             |            |            |                         |            |    |
| Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 10 15 20        |            |            |                         |            |    |
| TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC | 215             |            |            |                         |            |    |
| Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile     |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 25 30 35        |            |            |                         |            |    |
| ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG | 259             |            |            |                         |            |    |
| Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 40 45 50        |            |            |                         |            |    |
| GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA | 307             |            |            |                         |            |    |
| Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 55 60 65 70     |            |            |                         |            |    |
| AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC | 355             |            |            |                         |            |    |
| Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 75 80 85        |            |            |                         |            |    |
| CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT | 403             |            |            |                         |            |    |
| Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 90 95 100       |            |            |                         |            |    |
| GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA | 411             |            |            |                         |            |    |
| Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Asp Asn Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 105 110 115     |            |            |                         |            |    |
| GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTG CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC | 499             |            |            |                         |            |    |
| Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Pro Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 120 125 130     |            |            |                         |            |    |
| TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CGG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC | 547             |            |            |                         |            |    |
| Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 135 140 145 150 |            |            |                         |            |    |
| TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CGG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA | 595             |            |            |                         |            |    |
| Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 155 160 165     |            |            |                         |            |    |
| TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT | 643             |            |            |                         |            |    |
| Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp |                 |            |            |                         |            |    |
|   | 170 175 180     |            |            |                         |            |    |

FIG. 1

|   |      |
|---|------|
| CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC | 691  |
| Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser |      |
| 185 190 195   |      |
| CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC | 739  |
| Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys |      |
| 200 205 210   |      |
| ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG | 787  |
| Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg |      |
| 215 220 225 230   |      |
| GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC | 835  |
| Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser |      |
| 235 240 245   |      |
| ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA | 883  |
| Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr |      |
| 250 255 260   |      |
| GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG | 931  |
| Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala |      |
| 265 270 275   |      |
| GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG | 979  |
| Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu |      |
| 280 285 290   |      |
| GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT | 1027 |
| Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser |      |
| 295 300 305 310   |      |
| GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT | 1075 |
| Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro |      |
| 315 320 325   |      |
| ACC CTG TTT CTC GCT GTG TGG ATC ACC CTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC | 1123 |
| Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn |      |
| 330 335 340   |      |
| ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GCG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG | 1171 |
| Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln |      |
| 345 350 355   |      |
| GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG CTC AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT | 1219 |
| Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn |      |
| 360 365 370   |      |
| ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA | 1267 |
| Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg |      |
| 375 380 385 390   |      |

55. :

[illegible]

4/30

FIG. 2

|   |     |
|---|-----|
| TGGGCACAGC CACCCTGTTG GTAGTCCAGG GGCCAGCCCA CTGAGCTGGC ATATCAGCTG | 60  |
| GTGGCCCCGT TGGACTCGGC CCTAGGGAAC GGCGGCG ATG GGA GCG CCC CGG ATC  | 115 |
| Met Gly Ala Pro Arg Ile   |     |
| 1 5   |     |
| TCG CAC AGC CTT GCC TTG CTC CTC TGC TGC TCC GTG CTC AGC TCC GTC   | 163 |
| Ser His Ser Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys Ser Val Leu Ser Ser Val   |     |
| 10 15 20  |     |
| TAC GCA CTG GTG GAT GCC GAT GAT GTC ATA ACG AAG GAG GAG CAG ATC   | 211 |
| Tyr Ala Leu Val Asp Ala Asp Asp Val Ile Thr Lys Glu Glu Gln Ile   |     |
| 25 30 35  |     |
| ATT CTT CTG CGC AAT GCC CAG GCC CAG TGT GAG CAG CGC CTG AAA GAG   | 259 |
| Ile Leu Leu Arg Asn Ala Gln Ala Gln Cys Glu Gln Arg Leu Lys Glu   |     |
| 40 45 50  |     |
| GTC CTC AGG GTC CCT GAA CTT GCT GAA TCT GCC AAA GAC TGG ATG TCA   | 307 |
| Val Leu Arg Val Pro Glu Leu Ala Glu Ser Ala Lys Asp Trp Met Ser   |     |
| 55 60 65 70   |     |
| AGG TCT GCA AAG ACA AAG AAG GAG AAA CCT GCA GAA AAG CTT TAT CCC   | 355 |
| Arg Ser Ala Lys Thr Lys Lys Glu Lys Pro Ala Glu Lys Leu Tyr Pro   |     |
| 75 80 85  |     |
| CAG GCA GAG GAG TCC AGG GAA GTT TCT GAC AGG AGC CGG CTG CAG GAT   | 403 |
| Gln Ala Glu Glu Ser Arg Glu Val Ser Asp Arg Ser Arg Leu Gln Asp   |     |
| 90 95 100   |     |
| GGC TTC TGC CTA CCT GAG TGG GAC AAC ATT GTG TGC TGG CCT GCT GGA   | 451 |
| Gly Phe Cys Leu Pro Glu Trp Ser Ser Ile Val Cys Trp Pro Ala Gly   |     |
| 105 110 115   |     |
| GTG CCC GGC AAG GTG GTG GCC GTC CCC TGC CCC GAC TAC TTC TAC GAC   | 499 |
| Val Pro Gly Lys Val Val Ala Val Trp Cys Pro Asp Tyr Phe Tyr Asp   |     |
| 120 125 130   |     |
| TTC AAC CAC AAA GGC CGA GCC TAT CCG CGC TGT GAC AGC AAT GGC AGC   | 547 |
| Phe Asn His Lys Gly Arg Ala Tyr Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Ser   |     |
| 135 140 145 150   |     |
| TGG GAG CTG GTG CCT GGG AAC AAC CCG ACA TGG GCG AAT TAC AGC GAA   | 595 |
| Trp Glu Leu Val Pro Gly Asn Asn Arg Thr Trp Ala Asn Tyr Ser Glu   |     |
| 155 160 165   |     |
| TGT GTC AAG TTT CTG ACC AAC GAG ACC CGG GAA CGG GAA GTC TTT GAT   | 643 |
| Cys Val Lys Phe Leu Thr Asn Glu Thr Arg Glu Arg Glu Val Phe Asp   |     |
| 170 175 180   |     |

5/30

FIG. 2

2 of 2

|   |      |
|---|------|
| CGC CTC GGA ATG ATC TAC ACT GTG GGC TAC TCC ATC TCT CTG GGC TCC<br>Arg Leu Gly Met Ile Tyr Thr Val Gly Tyr Ser Ile Ser Leu Gly Ser<br>185 190 195     | 691  |
| CTC ACT GTG GCT GTG CTG ATT CTG GGT TAC TTT AGG AGG TTA CAT TGC<br>Leu Thr Val Ala Val Leu Ile Leu Gly Tyr Phe Arg Arg Leu His Cys<br>200 205 210     | 713  |
| ACC CGA AAC TAC ATT CAC ATG CAT CTC TTC GTG TCC TTT ATG CTC CGG<br>Thr Arg Asn Tyr Ile His Met His Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg<br>215 220 225 230 | 737  |
| GCT GTA AGC ATC TTC ATC AAG GAT GCT GTG CTC TAC TCG GGG GTT TCC<br>Ala Val Ser Ile Phe Ile Lys Asp Ala Val Leu Tyr Ser Gly Val Ser<br>235 240 245     | 835  |
| ACA GAT GAA ATC GAG CGC ATC ACC GAG GAG GAG CTG AGG GCC TTC ACA<br>Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ile Thr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Phe Thr<br>250 255 260     | 883  |
| GAG CCT CCC CCT GCT GAC AAG GCG GGT TTT GTG GGC TGC AGA GTG GCG<br>Glu Pro Pro Pro Ala Asp Lys Ala Gly Phe Val Gly Cys Arg Val Ala<br>265 270 275     | 931  |
| GTA ACC GTC TTC CTT TAC TTC CTG ACC ACC AAC TAC TAC TGG ATC CTG<br>Val Thr Val Phe Leu Tyr Phe Leu Thr Thr Asn Tyr Tyr Trp Ile Leu<br>280 285 290     | 979  |
| GTG GAA GGC CTC TAC CTT CAC AGC CTC ATC TTC ATG GCT TTT TTC TCT<br>Val Glu Gly Leu Tyr Leu His Ser Leu Ile Phe Met Ala Phe Phe Ser<br>295 300 305 310 | 1027 |
| GAG AAA AAG TAT CTC TGG GGT TTC ACA TTA TTT GGC TGG GGC CTC CCT<br>Glu Lys Lys Tyr Leu Trp Gly Phe Thr Leu Phe Gly Trp Gly Leu Pro<br>315 320 325     | 1075 |
| GCC GTG TTT GTC GCT GTG TGG GTG ACC GTG AGG GCT ACA CTG GCC AAC<br>Ala Val Phe Val Ala Val Trp Val Thr Val Arg Ala Thr Leu Ala Asn<br>330 335 340     | 1123 |
| ACT GAG TGC TGG GAC CTG AGT TCG GGG AAT AAG AAA TGG ATC ATA CAG<br>Thr Glu Cys Trp Asp Leu Ser Ser Gly Asn Lys Lys Trp Ile Ile Gln<br>345 350 355     | 1171 |
| GTG CCC ATC CTG GCA GCT ATT GTG GTG AAC TTT ATT CTT TTT ATC AAT<br>Val Pro Ile Leu Ala Ala Ile Val Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Asn<br>360 365 370     | 1219 |
| ATA ATC AGA GTC CTG GCT ACT AAA CTC CGG GAG ACC AAT GCA GGG AGA<br>Ile Ile Arg Val Leu Ala Thr Lys Leu Arg Glu Thr Asn Ala Gly Arg<br>375 380 385 390 | 1267 |

3 of 3

FIG. 2

[illegible]

7/30

1 of 3

FIG. 3

|            |            |            |            |            |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| GGCGGGGGCC | GCGGCGGCGA | GCTCGGAGGC | CGGCGGCGGC | TGCCCCGAGG | GACGCGGCCC | 60  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| TAGGCGGTGG | CG         | ATG        | GGG        | GCC        | GCC        | CGG | ATC | GCA | CCC | AGC | CTG | GCG | CTC | 108 |     |     |
|            |            | Met        | Gly        | Ala        | Ala        | Arg | Ile | Ala | Pro | Ser | Leu | Ala | Leu |     |     |     |
|            | 1          |            |            |            |            | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |
| CTA        | CTC        | TGC        | TGC        | CCA        | GTG        | CTC | AGC | TCC | GCA | TAT | GCG | CTG | GTG | GAT | GCG | 120 |
| Leu        | Leu        | Cys        | Cys        | Pro        | Val        | Leu | Ser | Ser | Ala | Tyr | Ala | Leu | Val | Asp | Ala |     |
|            |            | 15         |            |            |            | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |
| GAC        | GAT        | GTC        | TTT        | ACC        | AAA        | GAG | GAA | CAG | ATT | TTC | CTG | CTG | CAC | CGT | GCC | 204 |
| Asp        | Asp        | Val        | Phe        | Thr        | Lys        | Glu | Glu | Gln | Ile | Phe | Leu | Leu | His | Arg | Ala |     |
|            | 30         |            |            |            |            | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |
| CAG        | GCG        | CAA        | TGT        | GAC        | AAG        | CTG | CTC | AAG | GAA | GTT | CTG | CAC | ACA | GCA | GCC | 228 |
| Gln        | Ala        | Gln        | Cys        | Asp        | Lys        | Leu | Leu | Lys | Glu | Val | Leu | His | Thr | Ala | Ala |     |
| 45         |            |            |            |            | 50         |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| AAC        | ATA        | ATG        | GAG        | TCA        | GAC        | AAG | GGC | TGG | ACA | CCA | GCA | TCT | ACG | TCA | GGG | 240 |
| Asn        | Ile        | Met        | Glu        | Ser        | Asp        | Lys | Gly | Trp | Thr | Pro | Ala | Ser | Thr | Ser | Gly |     |
|            |            |            |            | 65         |            |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |
| AAG        | CCC        | AGG        | AAA        | GAG        | AAG        | GCA | TCG | GGA | AAG | TTC | TAC | CCT | GAG | TCT | AAA | 348 |
| Lys        | Pro        | Arg        | Lys        | Glu        | Lys        | Ala | Ser | Gly | Lys | Phe | Tyr | Pro | Glu | Ser | Lys |     |
|            |            |            | 80         |            |            |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |
| GAG        | AAC        | AAG        | GAC        | GTG        | CCC        | ACC | GGC | AGC | AGG | CGC | AGA | GGG | CGT | CCC | TGT | 396 |
| Glu        | Asn        | Lys        | Asp        | Val        | Pro        | Thr | Gly | Ser | Arg | Arg | Arg | Gly | Arg | Pro | Cys |     |
|            |            | 95         |            |            |            |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     |
| CTG        | CCC        | GAG        | TGG        | GAC        | AAC        | ATC | GTT | TGC | TGG | CCA | TTA | GGG | GCA | CCA | GGT | 444 |
| Leu        | Pro        | Glu        | Trp        | Asp        | Asn        | Ile | Val | Cys | Trp | Pro | Leu | Gly | Ala | Pro | Gly |     |
|            | 110        |            |            |            |            | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     |
| GAA        | GTG        | GTG        | GCA        | GTA        | CCT        | TGT | CCC | GAT | TAC | ATT | TAT | GAC | TTC | AAT | CAC | 492 |
| Glu        | Val        | Val        | Ala        | Val        | Pro        | Cys | Pro | Asp | Tyr | Ile | Tyr | Asp | Phe | Asn | His |     |
| 125        |            |            |            |            | 130        |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |
| AAA        | GGC        | CAT        | GCC        | TAC        | AGA        | CGC | TGT | GAC | CGC | AAT | GGC | AGC | TGG | GAG | GTG | 540 |
| Lys        | Gly        | His        | Ala        | Tyr        | Arg        | Arg | Cys | Asp | Arg | Asn | Gly | Ser | Trp | Glu | Val |     |
|            |            |            |            | 145        |            |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |
| GTT        | CCA        | GGG        | CAC        | AAC        | CGG        | ACG | TGG | GCC | AAC | TAC | AGC | GAG | TGC | CTC | AAG | 588 |
| Val        | Pro        | Gly        | His        | Asn        | Arg        | Thr | Trp | Ala | Asn | Tyr | Ser | Glu | Cys | Leu | Lys |     |
|            |            |            | 160        |            |            |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |
| TTC        | ATG        | ACC        | AAT        | GAG        | ACG        | CGG | GAA | CGG | GAG | GTA | TTT | GAC | CGC | CTA | GGC | 636 |
| Phe        | Met        | Thr        | Asn        | Glu        | Thr        | Arg | Glu | Arg | Glu | Val | Phe | Asp | Arg | Leu | Gly |     |
|            |            | 175        |            |            |            |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     |
| ATG        | ATC        | TAC        | ACC        | GTG        | GGA        | TAC | TCC | ATG | TCT | CTC | GCC | TCC | CTC | ACG | GTG | 684 |
| Met        | Ile        | Tyr        | Thr        | Val        | Gly        | Tyr | Ser | Met | Ser | Leu | Ala | Ser | Leu | Thr | Val |     |
|            | 190        |            |            |            |            | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     |     |



8/30

FIG. 3

2 of 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| GCT | GTG | CTC | ATC | CTG | GCC | TAT | TTT | AGG | CGG | CTG | CAC | TGC | ACG | CGC | AAC | 732  |
| Ala | Val | Leu | Ile | Leu | Ala | Tyr | Phe | Arg | Arg | Leu | His | Cys | Thr | Arg | Asn |      |
| 205 |     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |      |
| TAC | ATC | CAC | ATG | CAC | ATG | TTC | CTG | TCG | TTT | ATG | CTG | CGC | GCC | GCG | AGC | 780  |
| Tyr | Ile | His | Met | His | Met | Phe | Leu | Ser | Phe | Met | Leu | Arg | Ala | Ala | Ser |      |
|     |     |     |     | 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |      |
| ATC | TTC | GTG | AAG | GAC | GCT | GTG | CTC | TAC | TCT | GGC | TTC | ACG | CTG | GAT | GAG | 828  |
| Ile | Phe | Val | Lys | Asp | Ala | Val | Leu | Tyr | Ser | Gly | Phe | Thr | Leu | Asp | Glu |      |
|     |     |     | 240 |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |      |
| GCC | GAG | CGC | CTC | ACA | GAG | GAA | GAG | TTG | CAC | ATC | ATC | GCG | CAG | GTG | CCA | 876  |
| Ala | Glu | Arg | Leu | Thr | Glu | Glu | Glu | Leu | His | Ile | Ile | Ala | Gln | Val | Pro |      |
|     |     | 255 |     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |      |
| CCT | CCG | CCG | GCC | GCT | GCC | GCC | GTA | GGC | TAC | GCT | GGC | TGC | CGC | GTG | GCG | 924  |
| Pro | Pro | Pro | Ala | Ala | Ala | Ala | Val | Gly | Tyr | Ala | Gly | Cys | Arg | Val | Ala |      |
|     | 270 |     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     |      |
| GTG | ACC | TTC | TTC | CTC | TAC | TTC | CTG | GCT | ACC | AAC | TAC | TAC | TGG | ATT | CTG | 972  |
| Val | Thr | Phe | Phe | Leu | Tyr | Phe | Leu | Ala | Thr | Asn | Tyr | Tyr | Trp | Ile | Leu |      |
| 285 |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |      |
| GTG | GAG | GGG | CTG | TAC | TTG | CAC | AGC | CTC | ATC | TTC | ATG | GCC | TTT | TTC | TCA | 1020 |
| Val | Glu | Gly | Leu | Tyr | Leu | His | Ser | Leu | Ile | Phe | Met | Ala | Phe | Phe | Ser |      |
|     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |      |
| GAG | AAG | AAG | TAC | CTG | TGG | GGC | TTC | ACC | ATC | TTT | GGC | TGG | GGT | CTA | CCG | 1068 |
| Glu | Lys | Lys | Tyr | Leu | Trp | Gly | Phe | Thr | Ile | Phe | Gly | Trp | Gly | Leu | Pro |      |
|     |     | 320 |     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     |      |
| GCT | GTC | TTC | GTG | GCT | GTG | TGG | GTC | GCT | GTC | AGA | GCA | ACC | TTG | GCC | AAC | 1116 |
| Ala | Val | Phe | Val | Ala | Val | Trp | Val | Gly | Val | Arg | Ala | Thr | Leu | Ala | Asn |      |
|     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |      |
| ACT | GGG | TGC | TGG | GAT | CTG | AGC | TCC | GGG | CAC | AAG | AAG | TGG | ATC | ATC | CAG | 1164 |
| Thr | Gly | Cys | Trp | Asp | Leu | Ser | Ser | Gly | His | Lys | Lys | Trp | Ile | Ile | Gln |      |
| 350 |     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |      |
| GTG | CCC | ATC | CTG | GCA | TCT | GTT | GTG | CTC | AAC | TTC | ATC | CTT | TTT | ATC | AAC | 1212 |
| Val | Pro | Ile | Leu | Ala | Ser | Val | Val | Leu | Asn | Phe | Ile | Leu | Phe | Ile | Asn |      |
|     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |      |
| ATC | ATC | CGG | GTG | CTT | GCC | ACT | AAG | CTT | CGG | GAG | ACC | AAT | GCG | GGC | CGG | 1260 |
| Ile | Ile | Arg | Val | Leu | Ala | Thr | Lys | Leu | Arg | Glu | Thr | Asn | Ala | Gly | Arg |      |
|     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |      |
| TGT | GAC | ACC | AGG | CAG | CAG | TAC | CGG | AAG | CTG | CTC | AGG | TCC | ACG | TTG | GTG | 1308 |
| Cys | Asp | Thr | Arg | Gln | Gln | Tyr | Arg | Lys | Leu | Leu | Arg | Ser | Thr | Leu | Val |      |
|     |     | 400 |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 410 |     |     |     |      |

3 of 3

FIG. 3

|            |            |            |            |            |            |             |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| CTC        | GTG        | CCG        | CTC        | TTT        | GGT        | GTC         | CAC  | TAC | ACC | GTC | TTC | ATG | GCC | TTG | CCG | 1356 |
| Leu        | Val        | Pro        | Leu        | Phe        | Gly        | Val         | His  | Tyr | Thr | Val | Phe | Met | Ala | Leu | Pro |      |
| 415        |            |            |            |            |            | 420         |      |     |     |     | 425 |     |     |     |     |      |
| TAC        | ACC        | GAG        | GTC        | TCA        | GGG        | ACA         | TTG  | TGG | CAG | ATC | CAG | ATG | CAT | TAT | GAG | 1404 |
| Tyr        | Thr        | Glu        | Val        | Ser        | Gly        | Thr         | Leu  | Trp | Gln | Ile | Gln | Met | His | Tyr | Glu |      |
| 430        |            |            |            |            | 435        |             |      |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |      |
| ATG        | CTC        | TTC        | AAC        | TCC        | TTC        | CAG         | GGA  | TTT | TTT | GTT | GCC | ATC | ATA | TAC | TGT | 1452 |
| Met        | Leu        | Phe        | Asn        | Ser        | Phe        | Gln         | Gly  | Phe | Phe | Val | Ala | Ile | Ile | Tyr | Cys |      |
|            |            |            |            | 450        |            |             |      |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |      |
| TTC        | TGC        | AAT        | GGT        | GAG        | GTG        | CAG         | GCA  | GAG | ATT | AGG | AAG | TCA | TGG | AGC | CGC | 1500 |
| Phe        | Cys        | Asn        | Gly        | Glu        | Val        | Gln         | Ala  | Glu | Ile | Arg | Lys | Ser | Trp | Ser | Arg |      |
|            |            |            | 465        |            |            |             |      | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |      |
| TGG        | ACA        | CTG        | GCG        | TTG        | GAC        | TTC         | AAG  | CGC | AAA | GCA | CGA | AGT | GGG | AGT | AGC | 1548 |
| Trp        | Thr        | Leu        | Ala        | Leu        | Asp        | Phe         | Lys  | Arg | Lys | Ala | Arg | Ser | Gly | Ser | Ser |      |
|            |            | 480        |            |            |            |             | 485  |     |     |     |     | 490 |     |     |     |      |
| AGC        | TAC        | AGC        | TAT        | GGC        | CCA        | ATG         | GTG  | TCT | CAC | ACG | AGT | GTG | ACC | AAT | GTG | 1596 |
| Ser        | Tyr        | Ser        | Tyr        | Gly        | Pro        | Met         | Val  | Ser | His | Thr | Ser | Val | Thr | Asn | Val |      |
|            | 495        |            |            |            |            | 500         |      |     |     |     | 505 |     |     |     |     |      |
| GGC        | CCC        | CGT        | GCA        | GGA        | CTC        | AGC         | CTC  | CCC | CTC | AGC | CCC | CGC | CTG | CCT | CCT | 1644 |
| Gly        | Pro        | Arg        | Ala        | Gly        | Leu        | Ser         | Leu  | Pro | Leu | Ser | Pro | Arg | Leu | Pro | Pro |      |
| 510        |            |            |            |            | 515        |             |      |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |      |
| GCC        | ACT        | ACC        | AAT        | GGC        | CAC        | TCC         | CAG  | CTG | CCT | GGC | CAT | GCC | AAG | CCA | GGG | 1692 |
| Ala        | Thr        | Thr        | Asn        | Gly        | His        | Ser         | Gln  | Leu | Pro | Gly | His | Ala | Lys | Pro | Gly |      |
|            |            |            |            | 530        |            |             |      |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |      |
| GCT        | CCA        | GCC        | ACT        | GAG        | ACT        | GAA         | ACC  | CTA | CCA | GTC | ACT | ATG | GCG | GTT | CCC | 1740 |
| Ala        | Pro        | Ala        | Thr        | Glu        | Thr        | Glu         | Thr  | Leu | Pro | Val | Thr | Met | Ala | Val | Pro |      |
|            |            |            | 545        |            |            |             |      | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |      |
| AAG        | GAC        | GAT        | GGA        | TTC        | CTT        | AAC         | GGC  | TCC | TGC | TCA | GGC | CTG | GAT | GAG | GAG | 1788 |
| Lys        | Asp        | Asp        | Gly        | Phe        | Leu        | Asn         | Gly  | Ser | Cys | Ser | Gly | Leu | Asp | Glu | Glu |      |
|            |            | 560        |            |            |            |             | 565  |     |     |     |     | 570 |     |     |     |      |
| GCC        | TCC        | GGG        | TCT        | GCG        | CGG        | CCG         | CCT  | CCA | TTG | TTG | CAG | GAA | GGA | TGG | GAA | 1836 |
| Ala        | Ser        | Gly        | Ser        | Ala        | Arg        | Pro         | Pro  | Pro | Leu | Leu | Gln | Glu | Gly | Trp | Glu |      |
|            | 575        |            |            |            |            | 580         |      |     |     |     | 585 |     |     |     |     |      |
| ACA        | GTC        | ATG        | TGACTGGGCA | CTAGGGGGCT | AGACTGCTGG | CCTSGGGCACA | 1885 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| Thr        | Val        | Met        |            |            |            |             |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| 590        |            |            |            |            |            |             |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| TGGACAGATG | GACCAAGAAG | CCAGTGT    | TTTG       | GCTGGTTGTC | TATTCGGGAT | CTGGACCAGG  | 1945 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| AAGATAACAA | AAGGAAAATG | GAAGTGGACG | AAGCAGAGAA | GAAGGAAGAG | GTTTTGCAGG | 2005        |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
| AATTAAATAT | GTTTCCTCAG | TTGGATGATG | AGGACACAAG | GAAGGC     |            | 2051        |      |     |     |     |     |     |     |     |     |      |

Fig. 4

|                     |        |                   |        |
|---------------------|--------|-------------------|--------|
| Quality:            | 712.2  | Length:           | 595    |
| Ratio:              | 1.215  | Gaps:             | 6      |
| Percent Similarity: | 87.113 | Percent Identity: | 77.835 |

11/30

Fig. 5

```

R15 MGAARIAPSL ALLLCCPVLS SAYALVDADD VFTKEEQIFL LHRAQAQCDK 50
OkO MGAPRISHSL ALLLCCSVLS SVYALVDADD VITKEEQIIL LRNAQAQCEQ 50
Okh MGAPRISHSL ALLLCCSVLS SVYALVDADD VITKEEQIIL LRNAQAQCEQ 50
----- A -----

R15 LLKEVLHTAA NIMESDRGWT PASTSGKPRK EKASGKFYFE SKENKDVPTG 100
OkO RLKEVLR.VP ELAESAKDW. .MSRSAKTRK EKPAEKLYPQ AEESREVSOR 97
Okh RLKEVLR.VP ELAESAKDW. .MSRSAKTRK EKPAEKLYPQ AEESREVSOR 97

R15 SRRRGRPCLP EWDNIVCWPL GAPGEVVAVP CPDYIYDFNH KGHAYRRCDR 150
OkO SRLQDGFCLP EWDNIVCWPA GVPKGVVAVP CPDYFYDFNH KGRAYRRCDR 147
Okh SRLQDGFCLP EWDNIVCWPA GVPKGVVAVP CPDYFYDFNH KGRAYRRCDR 147
----- B -----
      N      N      N      N
R15 NGSWEVVP GH NRTWANYSEC LKFM TNETRE REVFDRLGMI YTVGYSMSLA 200
OkO NGSWELVPGN NRTWANYSEC VKFLTNETRE REVFDRLGMI YTVGYSISLG 197
Okh NGSWELVPGN NRTWANYSEC VKFLTNETRE REVFDRLGMI YTVGYSISLG 197
-----

R15 SLTVAVLILA YFRR LHCTRN YIHM HFLSF MLRAASIFVK DAVLYSGFTL 250
OkO SLTVAVLILG YFRR LHCTRN YIHM HFLVSP MLRAVSIFIK DAVLYSGVST 247
Okh SLTVAVLILG YFRR LHCTRN YIHM HFLVSP MLRAVSIFIK DAVLYSGVST 247
-- C ----- D -----

R15 DEAE RLTEEE LHIIAQVPPP PAAA AVGYAG CRVAVTFPLY FLATNYWIL 300
OkO DEIERITEEE LRAFTE...P PPADKAGFVG CRVAVTVFLY FLTTNYWIL 294
Okh DEIERITEEE LRAFTE...P PPADKAGFVG CRVAVTVFLY FLTTNYWIL 294
----- E -----

R15 VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV GVRATLANTG 350
OkO VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV TVRATLANTE 344
Okh VEGLYLHSLI FMAFFSEKKY LWGFTLPGWG LPAVTVAVWV TVRATLANTE 344
----- F ----- G -----

R15 CWDLSSGHKK WIIQVPILAS VVLNPFILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 400
OkO CWDLSSGNKK WIIQVPILAA IVVNPFILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 394
Okh CWDLSSGNKK WIIQVPILAA IVVNPFILFIN IIRVLATKLR ETNAGRCDTR 394
----- H -----

R15 QQYRKLLRST LVLVPLFGVH YTVFMALPYT EVSGTLWQIQ MHEYENLFNSF 450
OkO QQYRKLLKST LVLMLPLFGVH YIVFMATPYT EVSGILWQVQ MHEYENLFNSF 444
Okh QQYRKLLKST LVLMLPLFGVH YIVFMATPYT EVSGILWQVQ MHEYENLFNSF 444
----- I -----

R15 QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI RKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSSYSYGPHV 500
OkO QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI KKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSTYSYGPHV 494
Okh QGFFVAVIYC FCNGEVOAEI KKSWSRWTLA LDFKRRKARSG SSTYSYGPHV 494
-- J -----

R15 SHTSVTNVGP RAGLSLPLSP RLPP...ATT NGHSQLPGEA KPGAPATETE 547
OkO SHTSVTNVGP RGGLALSLSL RLPAGAGASA NGHBQLPGYV KHGSISENSL 544
Okh SHTSVTNVGP RGG..... . . . . .XPCPSA LD 515

R15 TLPVTMAVFK DDGFLNGSCS GLDEEASGSA RPPFLLQEGW ETVM 591
OkO PSSGPEPGTK DDGYLNG..S GLYEPHVG.E QPPPLLEER ETVM 585

```

12/30

FIG. 6

With 1 enzymes: SACT

February 27, 1992 18:30 ..

GGGATCCCGCGGCCCTAGGCGGTGGCGatgggGAccGCcgggatcgcacccggcctggcg  
 2 -----+----- 61  
 CCCTAGGGCGCCGGGATCCGCCACCCStácccCTggCGggccatagcgtgggcccggaccgc  
 b M G T A R I A P G L A -  
 ctccctgctctgctgccccgtgctcagctccgcgtacgcgctggtggatgcagatgacgtc  
 62 -----+----- 121  
 gaggacgagacgacggggcacgagtcgaggcgtatgcgcgaccacctacgtctactgcag  
 b L L L C C P V L S S A Y A L V D A D D V -  
 atgactaaagaggaacagatcttccctgctgcacccgtgctcaggcccagtgcgaaaaacgg  
 122 -----+----- 181  
 tactgattttctccctgctctagaaggacgacgtggcagcagtcggggtcacgctttttgce  
 b M T K E E Q I F L L H R A Q A Q C E K R -  
 ctcaaggaggctccctgcagaggccagccagcataatggaatcagacaagggatggacatct  
 182 -----+----- 241  
 gagttccctccaggacgtctccgggtcgggtcgtattaccttagtctgttccctacctgtaga  
 b L K E V L Q R P A S I M E S D K G W T S -  
 gcgtccacatcaggggaagcccaggaaagataaaggcatctgggaagctctacccctgagtct  
 242 -----+----- 301  
 cgcagggtgtagtcccttcgggtccctttctattcccttagacccttcgagatgggactcaga  
 b A S T S G K P R K D K A S G K L Y P E S -  
 gaggaggacaaggaggcaccactggcagcaggtaccgagggcgccctgtctgccggaa  
 302 -----+----- 361  
 ctccctccctgttccctccgtgggtgacccgtcgtccctgctcccgggggacagacggcctt  
 b E E D K E A P T G S T R E R P C L P E -  
 tgggaccacatccctctgctggccctctgggggcaccacgtcaggtggtggctgtgccctgt  
 362 -----+----- 421  
 accctgggtgtaggacacgacccggcgaccccccgtgggtccactccaccaccgacacgggaca  
 b W D H I L C W P L G A P E E V V A V P C -  
 ccggactacatttatgacttcaatcacaaaggccctgcccaccgacgtgtgaccgcaat  
 422 -----+----- 481  
 ggccctgatgtaataactgaaagttagtggttccgggtacggatggctgcgacactggcggtta  
 b P D Y I Y D F N H K G A A Y R R C D R N -  
 ggcagctgggaagctgctgcccgggcacacaggacccgggccaactacagcgagtgtgtc  
 482 -----+----- 541  
 ccgtccaccctccgaccacggacccctgttctccctgaccccggttgatgtcgtcacacag

13/80

U G S W E L V P G H N R T W A N I S E C V -  
 542 aaattttctctac atgagactcgtglaacgggaggtgtttgaccgcttgggcatgatttac  
 ----- 601  
 ttttaagagtgggtactctgagcacttgcctccacaaaactggcggaccggtactaaatg  
 b K F L T N E T R E R E V F D R L G M I Y -  
 602 accgtgggctactccgtgtccctggcgtccctcaccgtagctgtgctcatcctggcctac  
 ----- 661  
 tggcacccgatgaggcacagggaaccgcagggagtggcatcgacacgaataggaccggatg  
 b T V G Y S V S L A S L T V A V L I L A Y -  
 662 tttaggcggctgcactgcacgcgaactacatccacatgcacctgttctgtccttcctg  
 ----- 721  
 aaatccgccgacgtgacgtgcgcgttgatgtaggtgtacgtggacaaggacaggaagtac  
 b F R R L H C T R N Y I H M H L F L S F M -  
 722 ctgcgcgcgcgtgagcatcttcgtcaaggacgctgtgctctactctggcgccacgcttgat  
 ----- 781  
 gacgcgcgcgcaactcgtagaagcagttcctggacacgagatgagaccggtgcgaacta  
 b L R A V S I F V K D A V L Y S G A T L D -  
 782 gaggctgagcgcctcaccgaggaggagctgcgcgccatcggccaggcgccccgcgcct  
 ----- 841  
 ctccgactcgcgagtggtcctcctcgacgcgcggtagcgggtccgcggggcggcgga  
 b E A E R L T E E E L R A I A Q A P P P P -  
 842 gccaccgcccgtgccggtacgcgggtcgagggtggctgtgaccttcttcttacttc  
 ----- 901  
 cgggtggcggcgacggccgatgcgcccagctcccaccgacactggaagaaggaaatgaag  
 b A T A A A G Y A G C R V A V T F F L Y F -  
 902 ctggccaccaactactactcgattctcgttgggggtgtacctgcacagcctcatcttc  
 ----- 961  
 gaccggctgggtgatgatgacctaaaccacctcccccacatcgacgtctcggagtagaag  
 b L A T N Y Y W I L V E G L Y L H S L I F -  
 962 atggccttcttctcagagaagaagtacctgtggggcttcacagctcttcgggtggggtctg  
 ----- 1021  
 taccggaagaagaagtctcttcttcatggacacccgaaagtgcagaagccgaccccgagac  
 b M A F F S E K K Y L N S F T V F G W G L -  
 1022 cccgctgtcttcgtggctgtgtgggtcagtgctcagagctaccttggccaacaccgggtgc  
 ----- 1081  
 gggcgacagaagcaccgacacaccagtcacagctctcgatgggaccggttctggcccacg  
 b P A V F V A V W V S V R A T L A N T G C -

S  
 a  
 c  
 -

14/30

1032 tgggacttgagctcggggaacaaaaagtggtatcctccagggtgccccctccctggcctccatt  
 ----- 1141  
 accctgaactcagggcccttggtttttcacctagtaggtccacgggtaggaccggaggttaa  
 W D L S E G N K K W I I Q V P I L A S I -  
 1142 gtgctcaacttcatcctcttcatcaatatcctccgggtgctcgccaccaagcagcgggag  
 ----- 1201  
 cacgagttgaagtagggagaagtagttatagcaggccacgagcgggtgggttcgtcgccctc  
 V L N F I L F I N I V R V L A T K Q R E -  
 1202 accaacgcccggccggtgtgacacacggcagcagcaccggaagctgctcaaaccacgctg  
 ----- 1261  
 tgggttggggccggccacactgtgtgcccgtcgtcatggcccttcgacgagtttaggtgcyac  
 T N A G R C D T R Q C Y R K L L K S T L -  
 1262 gtgctcatgcccctctttggcggtccactacattgtcttcatggccacaccatacacccgag  
 ----- 1321  
 cacgagtagcggggagaaaaccgcaggtgatgttaacagaagcaccgggtgtgggtatgtggctc  
 V L M P L F G V H Y I V F M A T P Y T E -  
 1322 gtctcagggacgctctgggaagtcagatccactatgagatgctcttcaactccttccag  
 ----- 1381  
 cagagtccttgcgagaccgttcagggtctacgtcctactctacgagaagttgaggaaaggtc  
 V S G T L W Q V Q M H Y E M L F N S F Q -  
 1382 ggattttttgtcgcaatcatatactgtttctccatggcgaggtacaagctgagatcaag  
 ----- 1441  
 cctaaaaaacagcgttagtatatgacaaaagcgttaccgctccatgttcgactctagttc  
 G F F V A I I Y C F C H G E V Q A E I K -  
 1442 aaatcttggagccgctggacactggcactggacttccagccaaaggcacgcagcgggagc  
 ----- 1501  
 tttagaacctcggcgacctgtgacccgtgaccttcaacttcgcttccgtgctcgccctcg  
 K S W S R W T L A L I T H R K A R S G S -  
 1502 agcagctatagctacggcccccctcgtgtcccccacaaagtgtgaccaatgtcggcccccg  
 ----- 1561  
 tccctcctatccgatccgggggtaccacacgggtgtgttccactggttacagccgggggca  
 S S Y S Y G P M V S H T S V T N V G P R -  
 1562 gtgggactcggcctgccccctcagccccccctcctgcccactgccaccaccaacggccac  
 ----- 1621  
 caccctgagcccgacggggagtcggggggcggtacacgggtgacgggtgggtgtgcccgtg  
 V G L G L P L S P R L I F T A T T N G H -  
 1622 cctcagctgcccggccatgccaaagccagggaccccacccctggagaccctcgagaccaca  
 ----- 1681  
 ggagtcgacggaccggtacgggtccggtccctcgggtcgggacctctgggagctctggtgt  
 F Q L P G H A K P G T P A L E T L E T T -

15/30

1632 ----- 1741  
 ggcggacggtaccgacgaggggttcctgctacccaaaggacttgccgagggacgagtccggac

b P P A M A A P K D D G F L N G S C S G L -

1742 ----- 1801  
 ctgctcctccggagacccggactcgccgggtggacgggacgagtgtccttctcacccctctgt

b D E E A S G P E R P P A L L Q E Z W Z T -

1802 ----- 1861  
 cagtacactgggtccgacccccgacctggacgactgtatcacctacctgtctacctgggt

b V M

1862 ----- 1921  
 tttctaccaccaacttactaaagggtgagtccgggacccgggtctccttttttctccc

b

1922 ----- 1981  
 cttttttctttttttttctttttcttttttttttttttttttttttttttttttttttt

b

1982 ----- 2011  
 ttttttttttttttttttttttttttttttttttt

b

Enzymes that do cut:

SacI



16/30

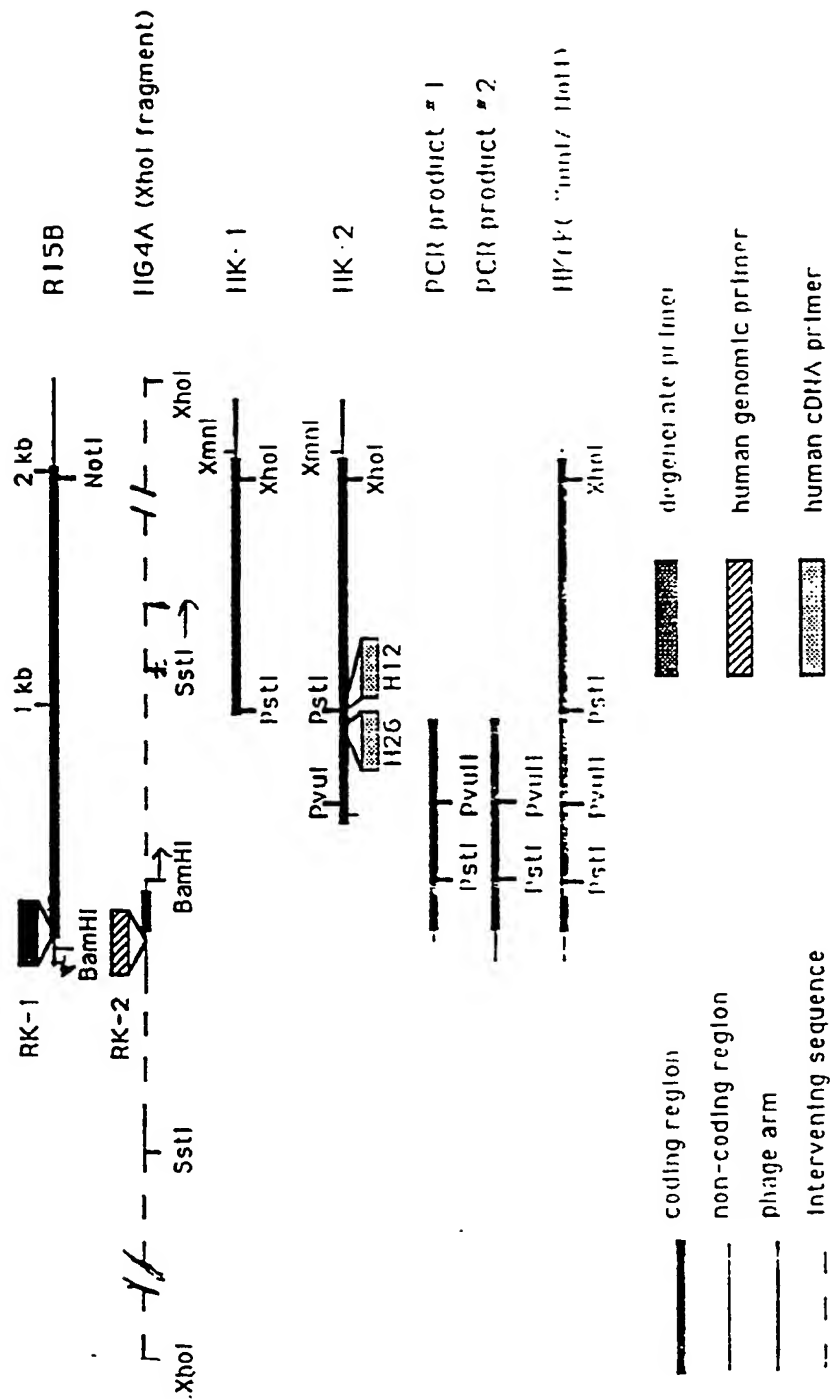


Fig. 7

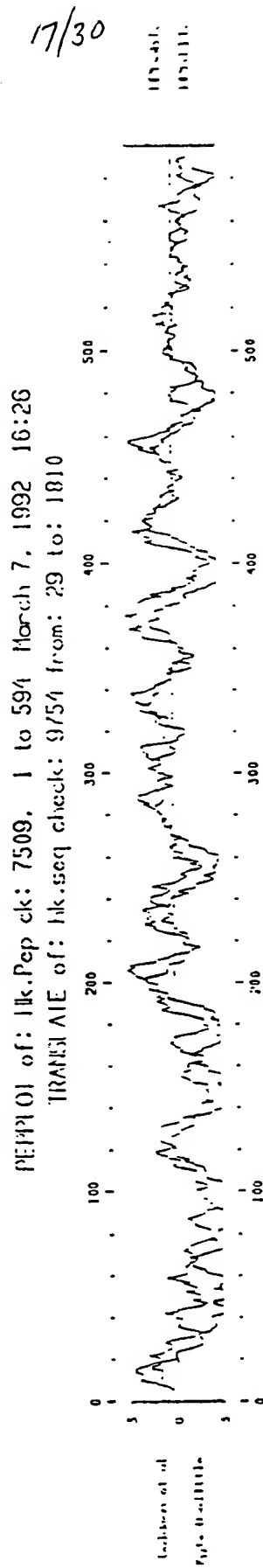
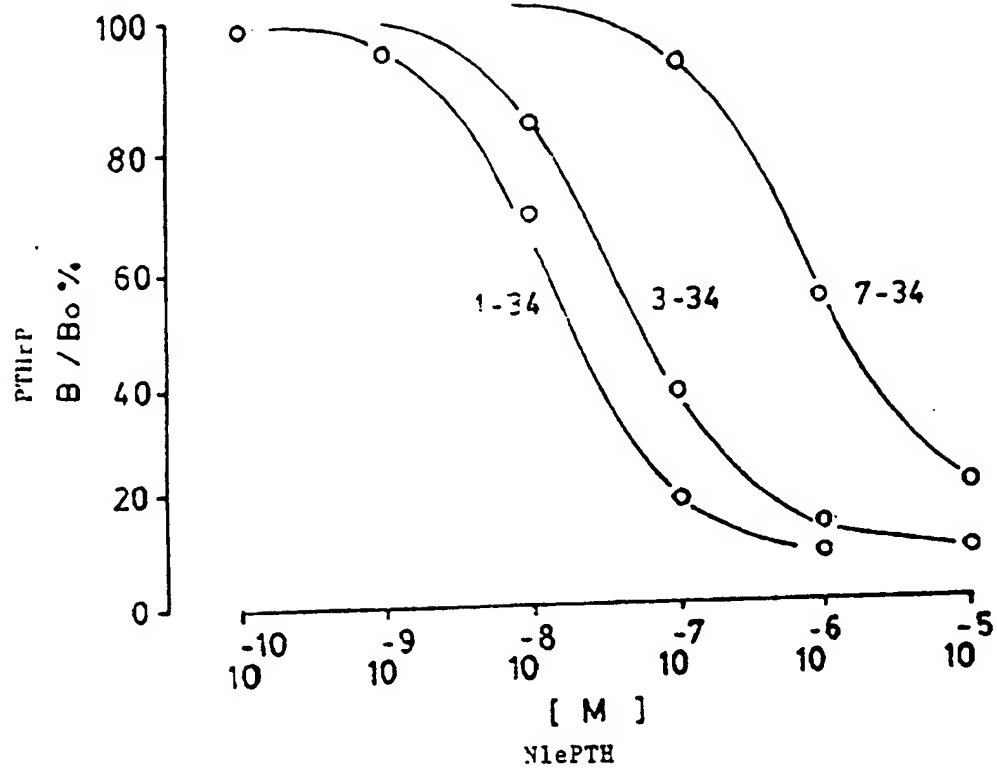


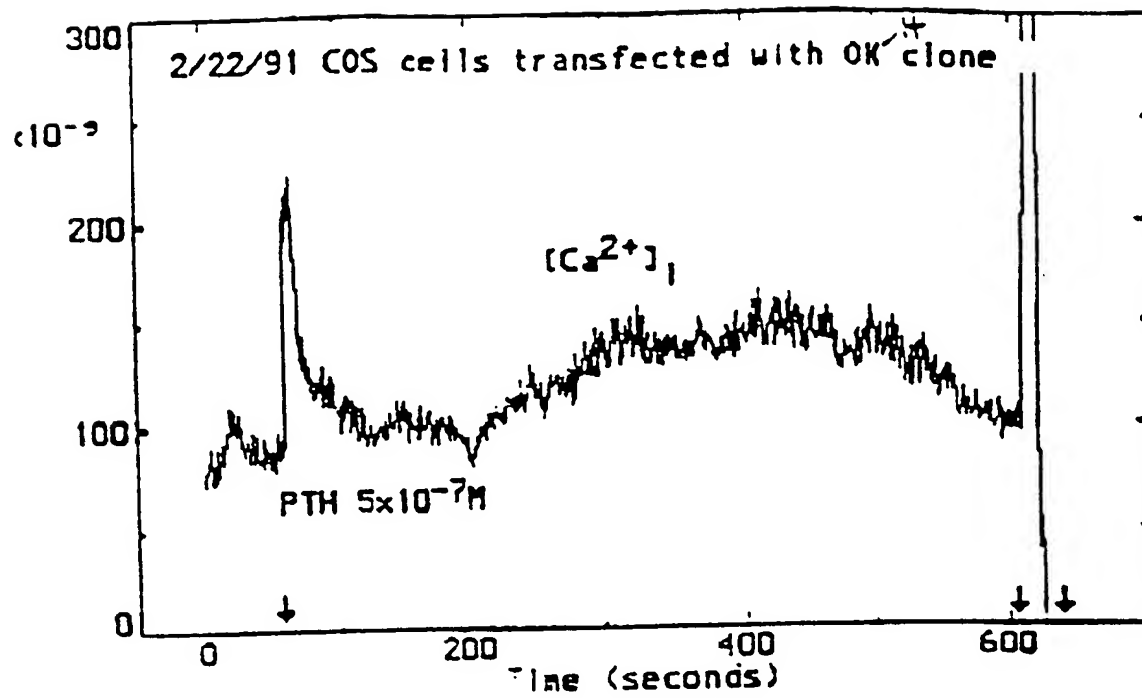
Fig.3

FIG. 9



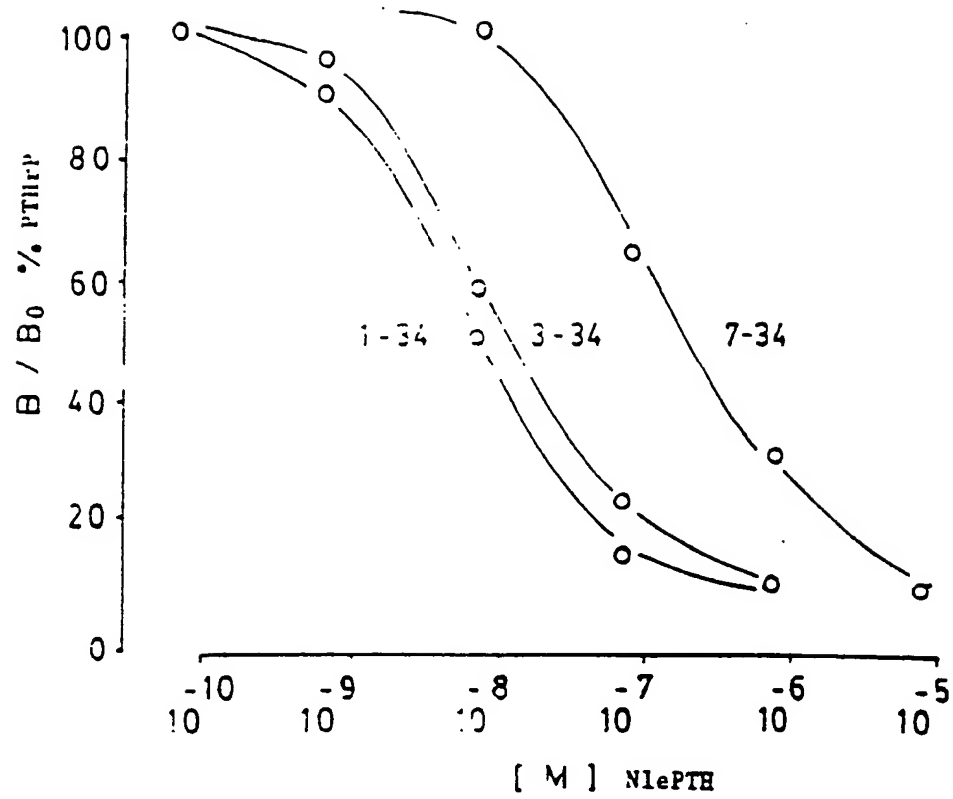
19/30

FIG. 10



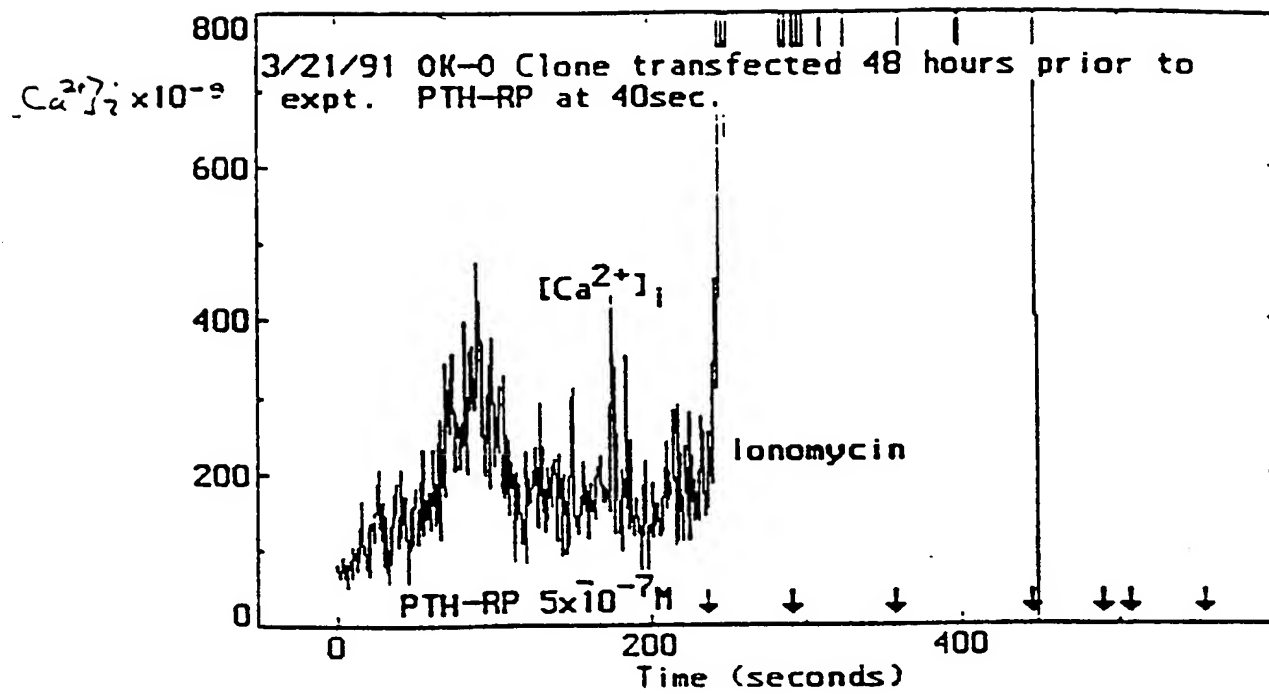
20/30

Fig. 11



21/30

FIG.12



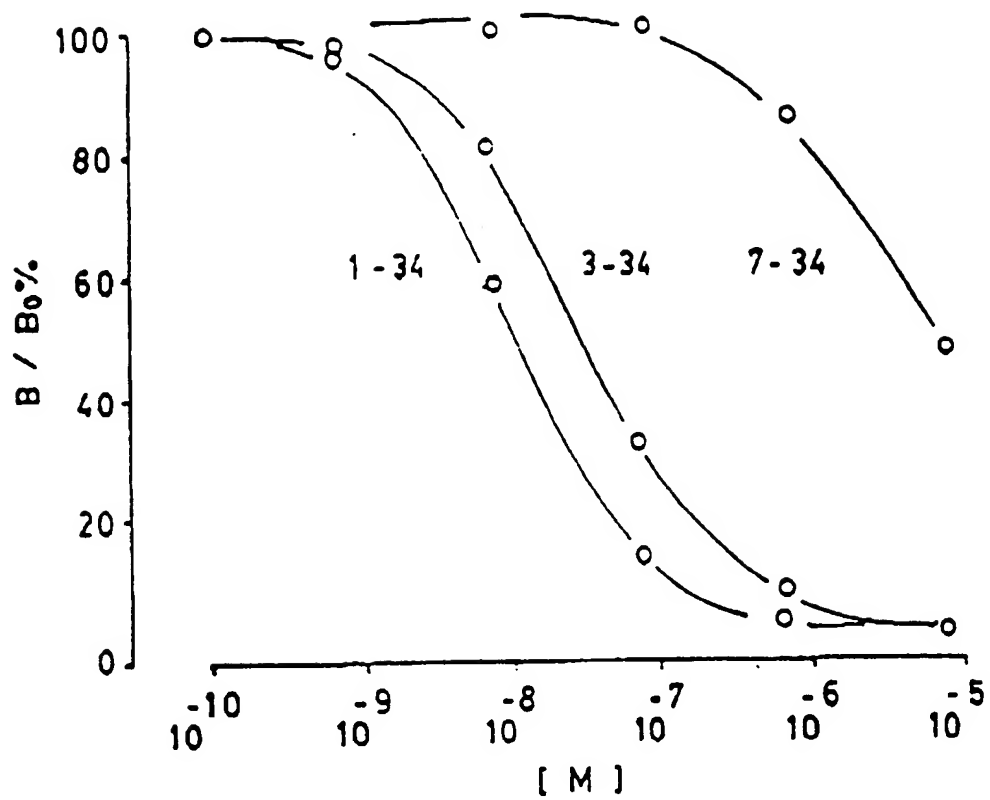
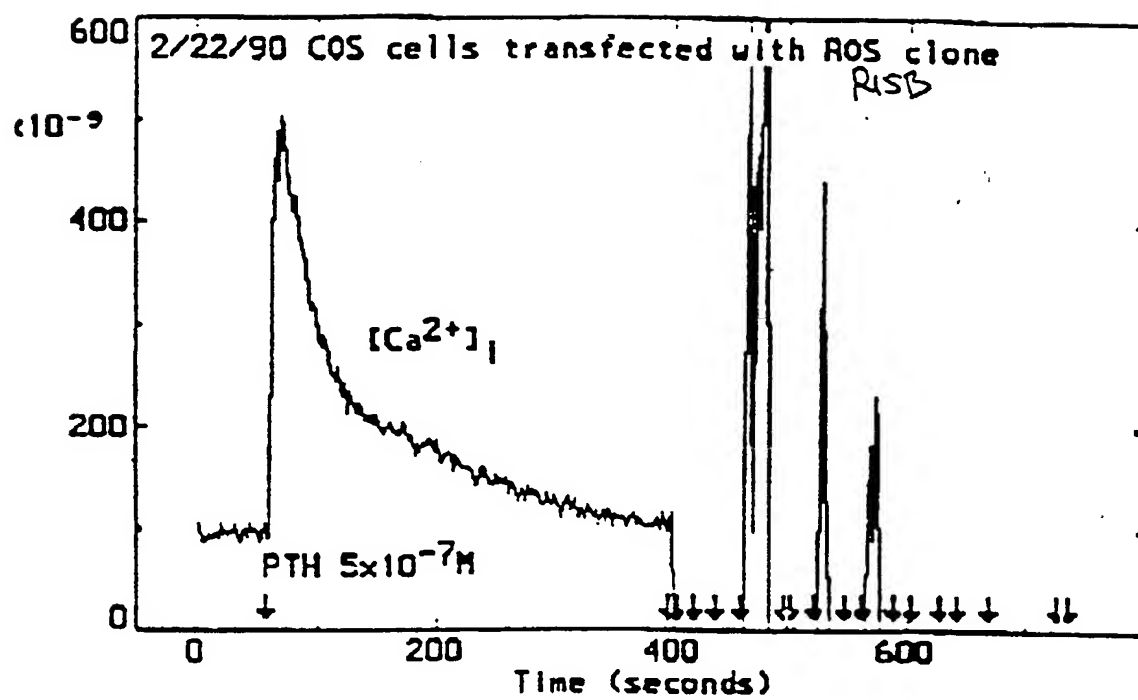


FIG. 13

23/30

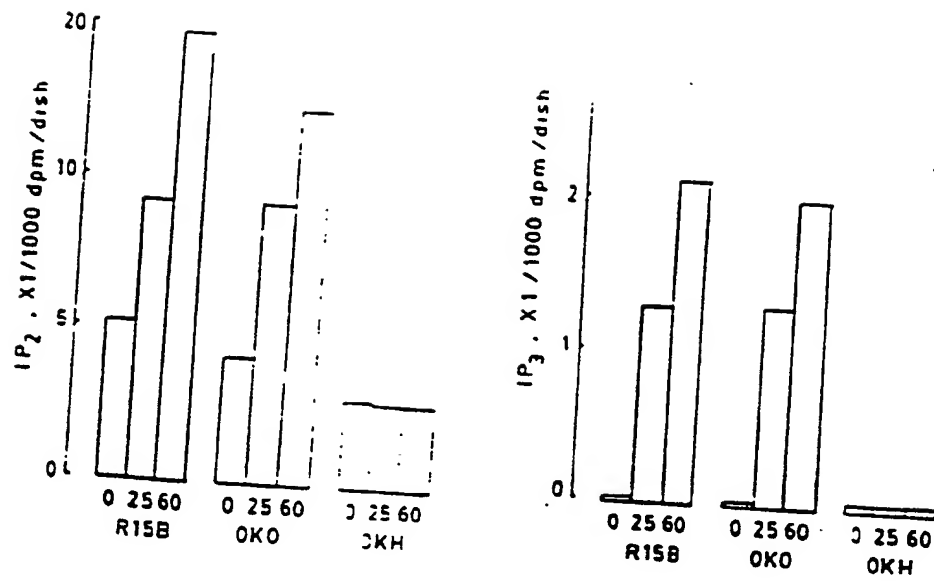
FIG. 14





24/30

FIG. 15



25/30

FIG. 16

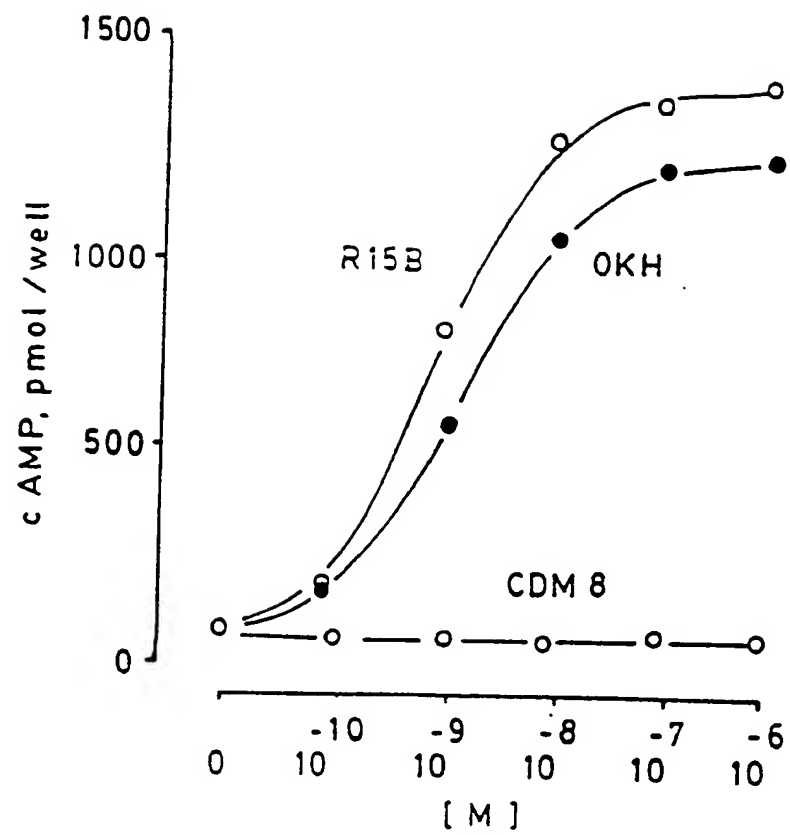


Fig. 17

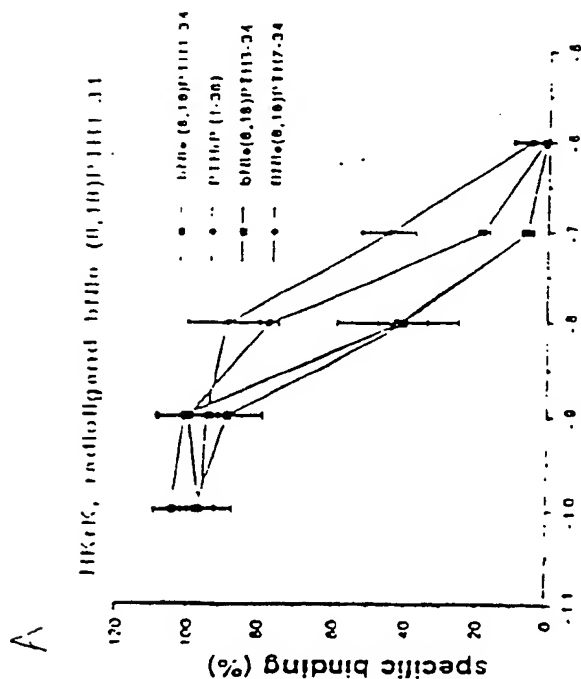
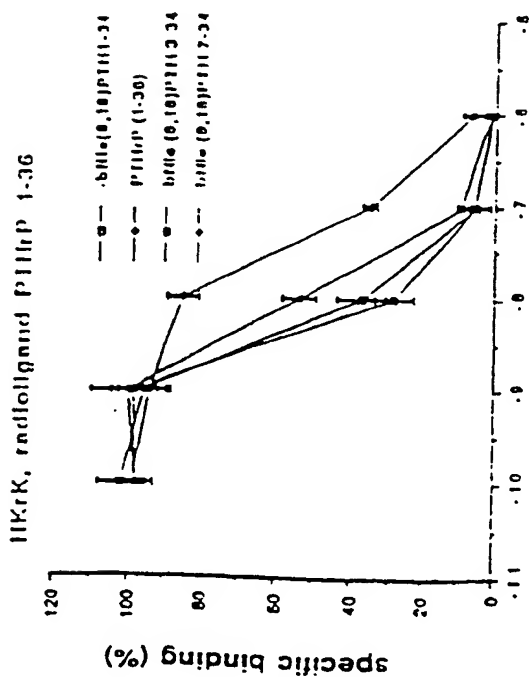
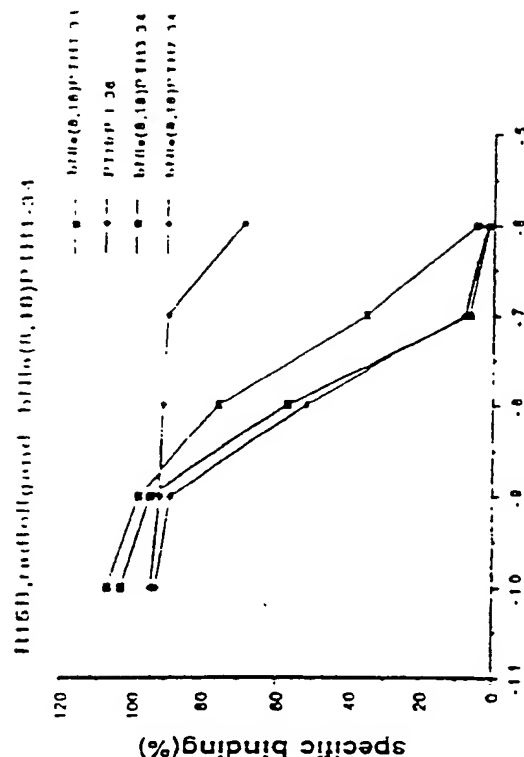
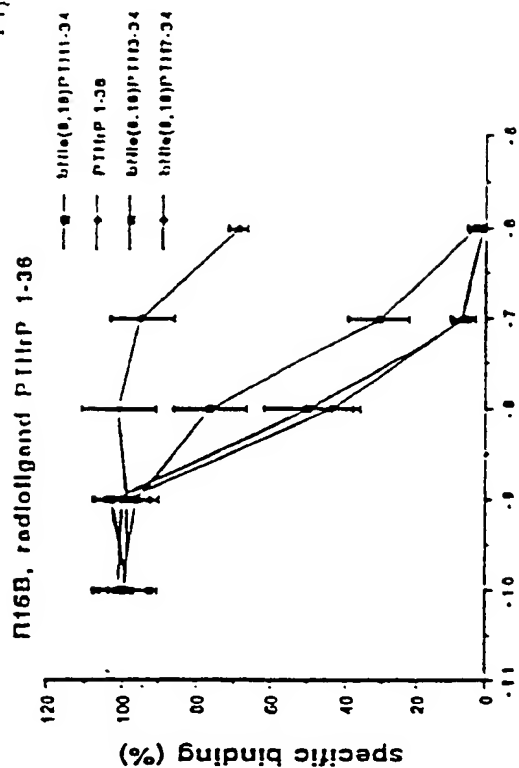


Fig. 18

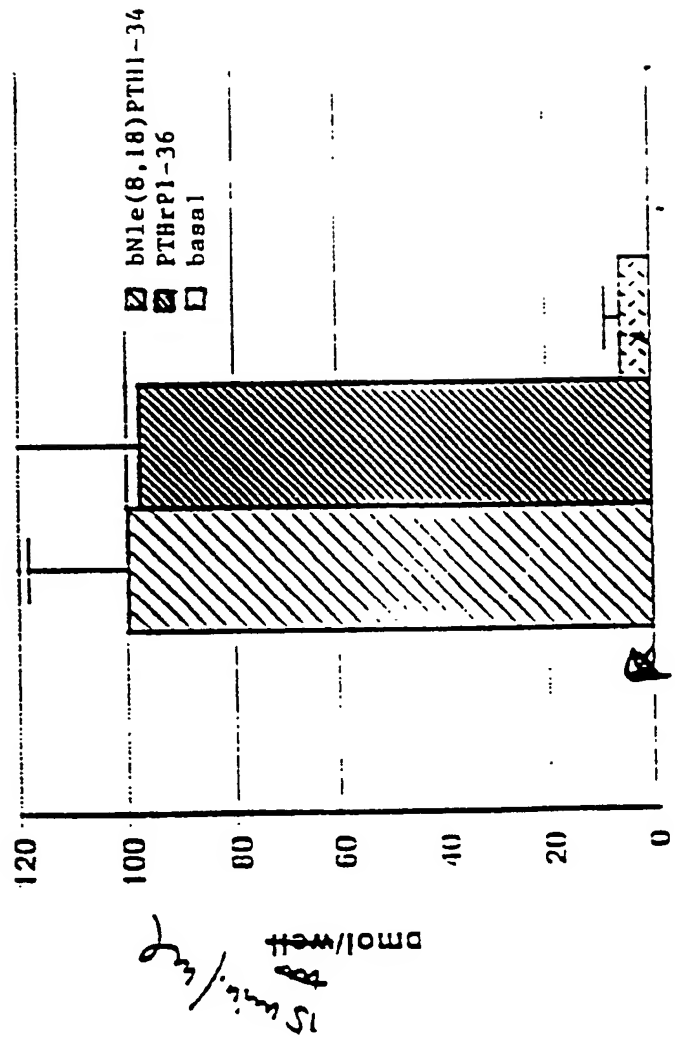
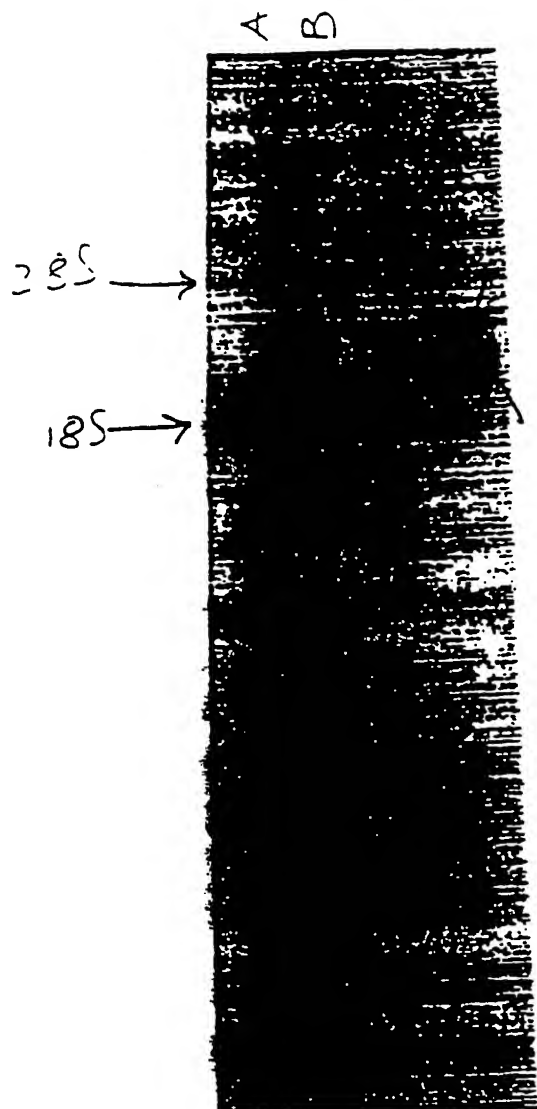


Fig. 19



29/30

Fig. 20



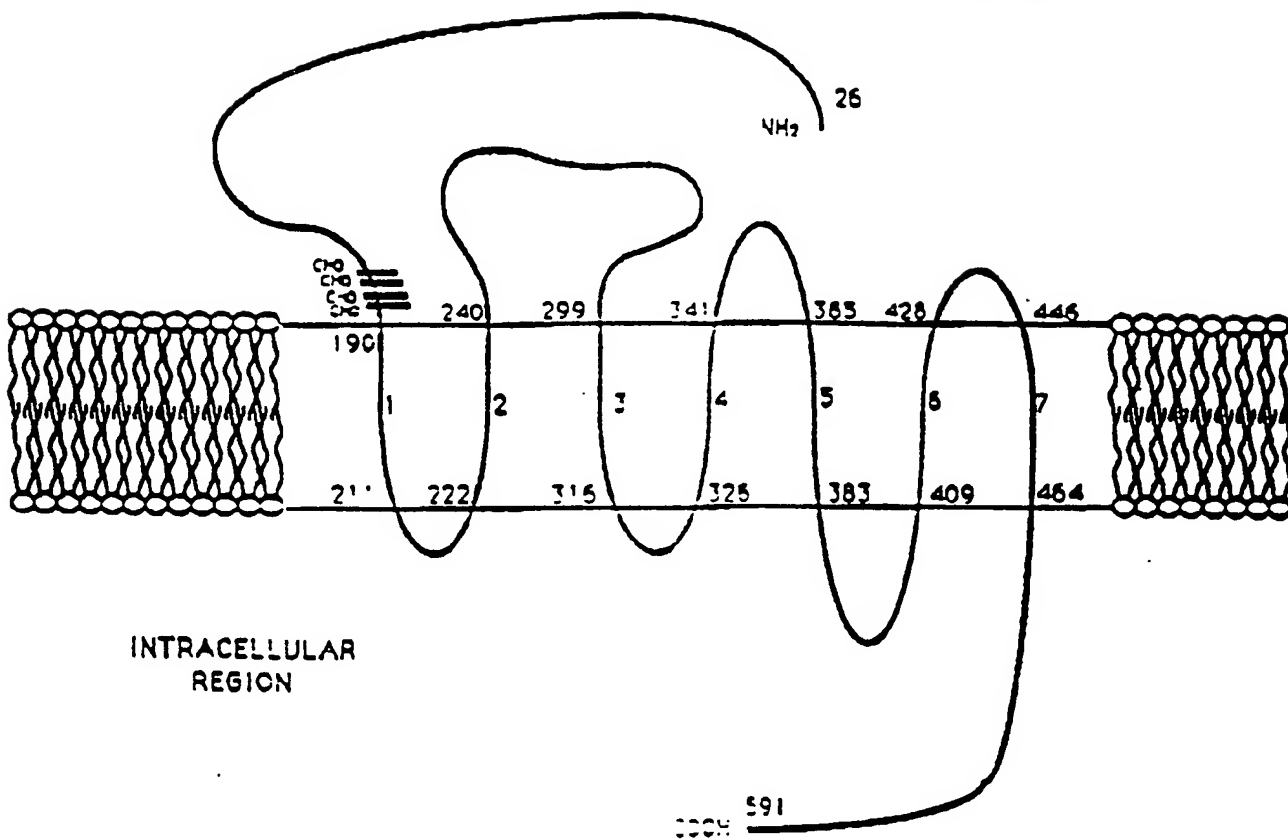
(1)

30/30

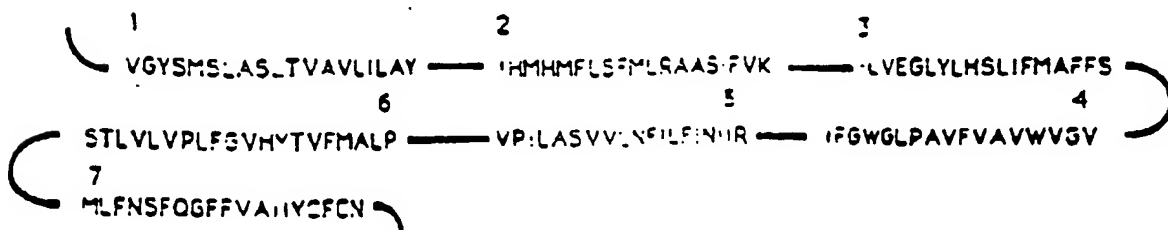
Fig. 21

# RAT BONE PTH/PTHrP RECEPTOR

EXTRACELLULAR  
REGION



## AMINO ACID SEQUENCE OF 7 PUTATIVE TRANS-MEMBRANE REGIONS



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US92/02821

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(5) : Please See Extra Sheet.

US CL : 435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29; 530/350, 387, 397, 399.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : APS AND COMMERCIAL DATABASES (DIALOG) 435/69.1, 240.2, 320.1; 536/27, 28, 29

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DIALOG AND ONLINE SEQUENCE SEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.    |
|-----------|--|--------------------------|
| X<br>Y    | TWENTY-SEVENTH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR CELL BIOLOGY, VOLUME 105, NO. 4, PT. 2, ISSUED OCTOBER 1987, R. A. LUBEN ET AL., "MOLECULAR CLONING OF A PARATHYROID HORMONE RECEPTOR-RELATED MEMBRANE PROTEIN FROM MOUSE BONE CELLS", ENTIRE DOCUMENT.  | 1-19, 39<br>20-38, 40-49 |
| Y         | THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, VOL 265, NO. 1, ISSUED 05 JANUARY 1990, ABOU-SAMRA ET AL., "CHARACTERIZATION OF FULLY ACTIVE BIOTINYLATED PARATHYROID HORMONE ANALOGS", PAGES 58-62, ENTIRE DOCUMENT.   | 1-49<br>-                |
| Y         | BIOCHEMISTRY, VOLUME 29, NO. 30, ISSUED 31 JULY 1990, JUPPNER ET AL., "PREPARATION AND CHARACTERIZATION (N-(4-AZIDO-2-NITROPHENYL)ALA, TYR-36)-PATHYROID HORMONE RELATED PEPTIDE (1-36) AMIDE: A HIGH-AFFINITY, PARTIAL AGONIST HAVING HIGH CROSS-LINKING EFFICIENCY WITH ITS RECEPTOR ON ROS 17/2.8 CELLS", PAGES 6941-6946, ENTIRE DOCUMENT. | 1-49                     |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

|   |     |  |
|---|-----|--|
| * Special categories of cited documents:  | *T  | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance   | *X* | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| *E* earlier document published on or after the international filing date  | *Y* | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | *Z* | document member of the same patent family  |
| *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |     |  |
| *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |     |  |

Date of the actual completion of the international search

01 JULY 1992

Date of mailing of the international search report

31 JUL 1992

Name and mailing address of the ISA/  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No.

Authorized officer

GIAN WANG

Telephone No. (703) 308-3993



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US92/02821

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (5):

C12P 21/06; C12N 5/00, 15/00; C07H 15/12, 17/00; C07K 3/00; A61K 35/14, 37/24, 37/36.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**